

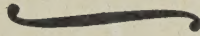
THÈSES PRÉSENTÉES
POUR L'OBTENTION
DU TITRE
de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ
de PARIS

(Mention SCIENCES)

à

l'UNIVERSITÉ de PARIS VI

par M^{lle} Myriam JOUANNEAU



SUJET DE LA 1^{ère} THESE :

EFFETS DES IMMUNOSUPPESSEURS ET DES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES
SUR LES POLYARTHRITES EXPÉRIMENTALES.

SUJET DE LA 2^{ème} THESE :

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS IMMUNOSUPPRESSIVES DES ANTI-MITOTIQUES
CHEZ L'ANIMAL

soutenues le 28 Octobre 1971 devant la Commission composée de :

PRÉSIDENT : Monsieur le Professeur A. THOMAS

EXAMINATEURS : Monsieur le Professeur A. HOLLANDE
Monsieur le Professeur P. CARTIER

INVITÉ : Monsieur le Professeur F. DELBARRE

THÈSES PRESENTÉES
POUR L'OBTENTION
DU TITRE
de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ
de PARIS

(Mention SCIENCES)

à

l'UNIVERSITÉ de PARIS VI

par M^{lle} Myriam JOUANNEAU

SUJET DE LA 1^{ère} THESE :

EFFETS DES IMMUNOSUPPRESSEURS ET DES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES
SUR LES POLYARTHRITES EXPÉRIMENTALES.

SUJET DE LA 2^{ème} THESE :

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS IMMUNOSUPPRESSIVES DES ANTI-MITOTIQUES
CHEZ L'ANIMAL

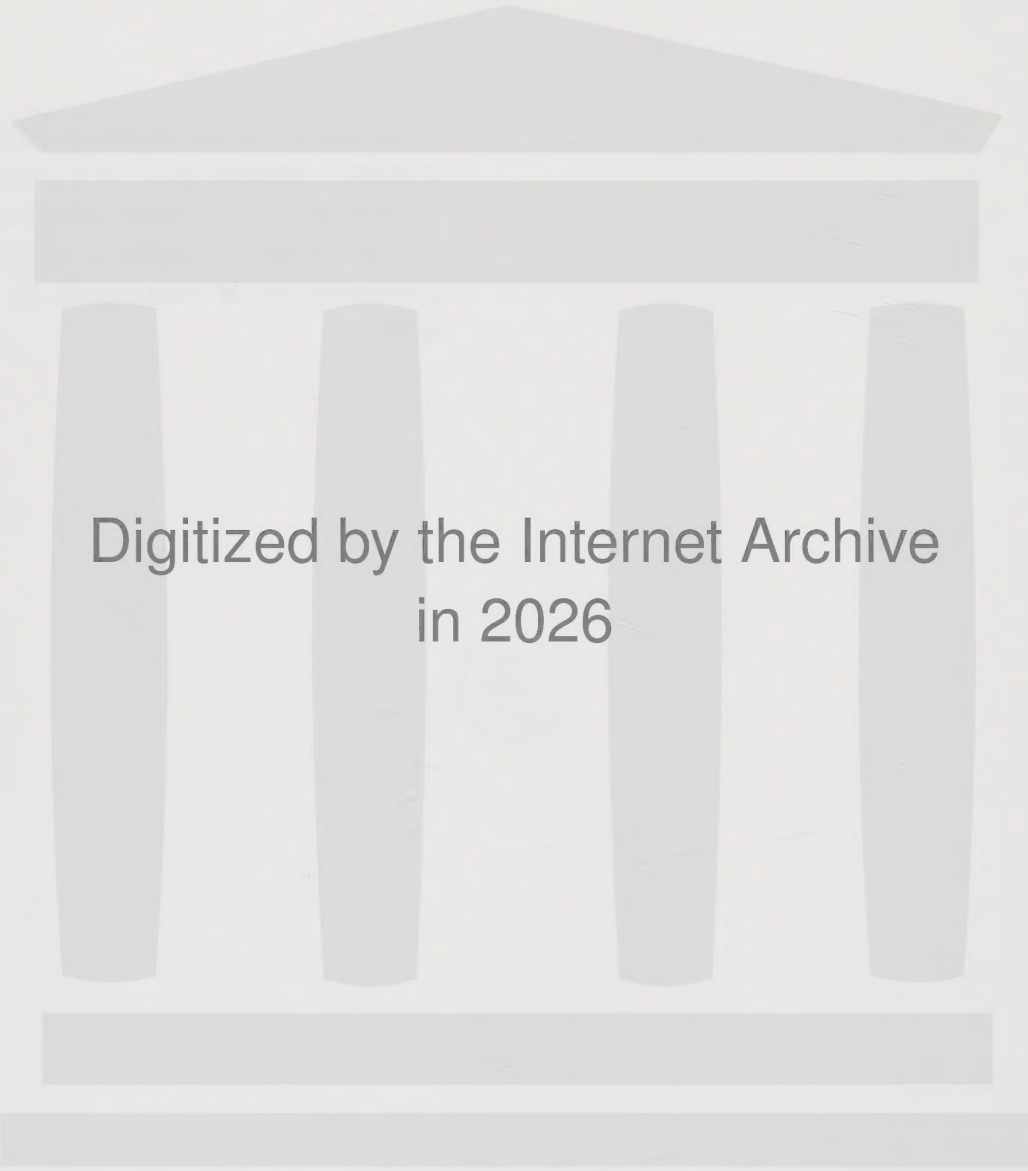
soutenues le 28 Octobre 1971 devant la Commission composée de :

PRÉSIDENT : Monsieur le Professeur A. THOMAS
EXAMINATEURS : Monsieur le Professeur A. HOLLANDE
Monsieur le Professeur P. CARTIER
INVITÉ : Monsieur le Professeur F. DELBARRE



A Monsieur le Professeur A. THOMAS
Membre de l'Académie des Sciences
Professeur à l'Université PARIS VI
— Biologie Cellulaire —
Officier de la Légion d'Honneur

J'exprime toute ma gratitude pour les
précieux conseils qu'il m'a toujours
donnés avec une grande amabilité.
Je le remercie d'avoir accepté la
présidence de la soutenance de ma
thèse.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556004_0029

*A Monsieur le Professeur F. DELBARRE,
Doyen de la Faculté de Médecine*

*COCHIN PORT-ROYAL, Université René DESCARTES PARIS V,
Professeur de la clinique rhumatologique à l'hôpital Cochin,
Chevalier de la Légion d'Honneur*

Je lui exprime ma profonde reconnaissance.
Il m'a permis de travailler dans son centre
de recherches sur les maladies ostéo-articulaires
(Unité n° 5 INSERM).

Je le remercie de m'avoir proposé le sujet de
cette thèse dont il est le rapporteur.

Il m'a toujours conseillée et aidée avec la
plus grande gentillesse dans la réalisation de
ce travail.

*A Monsieur le Professeur A. HOLLANDE,
Professeur à l'Université PARIS VI
— Biologie Cellulaire —*

Je lui exprime toute ma reconnaissance pour
les conseils qu'il m'a donnés et le remercie
d'avoir accepté d'être membre du jury.

*A Monsieur le Professeur P. CARTIER,
Professeur à l'Université René DESCARTES PARIS V
— Biologie humaine, chimie biologique —
Faculté Necker-Enfants Malades,
Chevalier de la Légion d'Honneur*

Je le prie d'accepter toute ma gratitude
pour les conseils et la gentillesse qu'il m'a
apportés dans l'exécution de ce travail.
Je le remercie d'avoir accepté d'être membre
du jury.

A mes Parents,

qui par leur compréhension et leur soutien m'ont aidée à réaliser ce travail, je leur témoigne ma profonde affection.

*Au Docteur H. BROUILHET,
Maître de recherche de l'I.N.S.E.R.M.*

qui avec bienveillance m'a appris à travailler et m'a aidée avec toute sa gentillesse dans la réalisation de ma thèse : Merci.

A mes collaborateurs du centre de recherches,

qui m'ont aidée dans ce travail, j'adresse tous mes remerciements.

PLAN

1 – INTRODUCTION

2 – MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1. GÉNÉRALITÉS

2.2. LES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES (SAL)

- 2.2.1. Techniques de préparations des sérums
- 2.2.2. Mode d'action
- 2.2.3. Détermination de l'activité «IN VITRO»

2.3. LES ANTI-MITOTIQUES

- 2.3.1. Structures chimiques
- 2.3.2. Mécanisme d'action
- 2.3.3. Préparations utilisées

2.4. LA POLYARTHRITE DU RAT A ADJUVANT

- 2.4.1. Induction de la maladie
- 2.4.2. Test à la tuberculine
- 2.4.3. Mise en évidence d'éventuels anticorps circulants
- 2.4.4. Étude des modifications hématologiques
- 2.4.5. Mode d'administration des traitements immunosuppresseurs

2.5. LA POLYARTHRITE DU RAT A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS

- 2.5.1. Conservation de la tumeur
- 2.5.2. Préparation de l'exsudat arthrogène
- 2.5.3. Induction de la polyarthrite
- 2.5.4. Autopsie des animaux
- 2.5.5. Mode d'administration des traitements immunosuppresseurs

2.6. LA MONOARTHRITE DU LAPIN INDUITE PAR UN EXSUDAT INFLAMMATOIRE HOMOLOGUE

- 2.6.1. Production de l'exsudat
- 2.6.2. Immunisation des lapins
- 2.6.3. Déclenchement de l'arthrite
- 2.6.4. Dissection des articulations
- 2.6.5. Histologie
- 2.6.6. Modalité du traitement par le cyclophosphamide

2.7. ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ CIRCULANTE : LA FORMATION DES ANTICORPS ANTI-HÉMATIES DE MOUTON CHEZ LE RAT

- 2.7.1. Immunisation des rats
- 2.7.2. Test d'hémagglutination
- 2.7.3. Détermination de la nature des anticorps
- 2.7.4. Mode d'administration des traitements immunosuppresseurs

2.8. LES ALLOGREFFES CUTANÉES CHEZ LE RAT

2.8.1. Choix des animaux

2.8.2. Technique de la greffe

2.8.3. Modalités des greffes

2.8.4. Modalités des traitements immunosuppresseurs

2.9. ÉTUDE COMPARÉE DES PROPRIÉTÉS ANTI-INFLAMMATOIRES ET DES EFFETS CYTOTOXIQUES DES IMMUNOSUPPESSEURS CHEZ LE RAT

2.9.1. L'œdème à la carragénine

2.9.2. Le test du pellet d'ivalon

2.9.3. Le test du granulome à la carragénine

2.9.4. Étude de la cytotoxicité des anti-mitotiques

3 — R É S U L T A T S

3.1. ACTIVITÉS «IN VITRO» DES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES

3.1.1. La lymphoagglutination

3.1.2. La lymphostimulation

3.1.3. L'inhibition de la migration des thymocytes

3.2. LA POLYARTHRITE DU RAT A ADJUVANT

3.2.1. Description de l'arthrite et des lésions viscérales

3.2.2. Signes biologiques

3.2.3. La polyarthrite traitée par les sérums anti-lymphocytaires

3.2.4. La polyarthrite traitée par les anti-mitotiques

3.3. LA POLYARTHRITE DU RAT A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS

3.3.1. Description et cotation de l'arthrite

3.3.2. Effets des SAL et des anti-mitotiques sur les manifestations articulaires

3.3.3. Toxicité des anti-mitotiques

3.3.4. Autopsie des animaux

3.4. EFFET DU CYCLOPHOSPHAMIDE SUR LA MONOARTHRITE DU LAPIN INDUITE PAR UN EXSUDAT INFLAMMATOIRE HOMOLOGUE

3.4.1. Contrôle de l'immunisation et cotation de l'arthrite

3.4.2. Lésions histologiques de la synoviale

3.4.3. Variation du poids corporel et des données hématologiques des lapins avant et après traitement

3.4.4. Étude du liquide synovial

3.5. ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ CIRCULANTE CHEZ LE RAT

3.5.1. Effets des SAL et des anti-mitotiques

3.5.2. Nature des anticorps

3.6. L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION CUTANÉE CHEZ LE RAT

3.6.1. Valeur de la méthode

3.6.2. Essai des traitements immunosuppresseurs

**3.7. ÉTUDE COMPARÉE DES PROPRIÉTÉS ANTI-INFLAMMATOIRES ET DES EFFETS CYTOTOXIQUES
DES IMMUNOSUPPRESSEURS CHEZ LE RAT**

3.7.1. L'œdème à la carragénine

3.7.2. Le test du pellet d'ivalon

3.7.3. Le test du granulome à la carragénine

3.7.4. Étude de la cytotoxicité des anti-mitotiques

4 – DISCUSSION

5 – RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

6 – BIBLIOGRAPHIE

LES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

1 — LES CALCULS STATISTIQUES

F	:	Test F de SNEDECOR
m	:	Moyenne
N.S.	:	Non Significatif
s	:	Écart standard
t	:	Test t de STUDENT
tsm	:	Intervalle de confiance de la moyenne pour $p = 0,05$
% V $\frac{\circ}{\circ}$ T	:	Pourcentage de variation par rapport aux témoins.
W	:	Test non paramétrique de WILCOXON

2 — LES TRAITEMENTS UTILISÉS

— les voies d'administration

I.A.	:	Intra-articulaire
I.D.	:	Intra-dermique
I.M.	:	Intra-musculaire
I.P.	:	Intra-péritonéale
I.V.	:	Intra-veineuse
S/C	:	Sous-cutanée

— la nature des traitements

SAL	:	Sérums anti-lymphocytaires de lapin anti-rat
SAL-G	:	SAL anti-cellules ganglionnaires
SAL-S	:	SAL anti-cellules spléniques
SAL-T	:	SAL anti-thymocytes
SAL-MT	:	SAL anti-membranes de thymocytes
SAL-NT	:	SAL anti-nucléoprotéines de thymocytes
SN	:	Sérum normal de lapin
AZA. . .	:	Azathioprine (Imurel-Wellcome Paris)
CHLO . . .	:	Chlorambucil (Chloraminophène-Techni-Pharma Monaco)
C.P.P.	:	Cyclophosphamide (Endoxan-Asta-Lucien Colombes)
5-FU	:	5-fluoro uracile (Fluoro-Uracile «Roche» Paris)
MTX	:	Méthotrexate (Méthotrexate - Spécia Paris)
PHA	:	Phytohémagglutinine
S. phys.	:	Sérum physiologique
T	:	Témoins

I - INTRODUCTION

1 - INTRODUCTION ET HISTORIQUE

Certaines maladies articulaires inflammatoires surviennent après un conflit immunologique. Le plus souvent, l'antigène déclenchant est inconnu. Cependant, un micro-organisme peut, dans certains cas, être mis en cause.

Quelle que soit la nature de l'antigène, des cellules immunocompétentes sont sensibilisées. Dans les rhumatismes inflammatoires, les cellules concernées sont essentiellement les lymphocytes thymodépendants. Lorsqu'ils sont stimulés, ils se transforment en immunoblastes et synthétisent des facteurs solubles phlogogènes.

Sur le plan thérapeutique, les médicaments anti-inflammatoires ne s'attaquent qu'au symptôme. Le traitement étiologique comporte la destruction soit de l'antigène, soit des cellules immunocompétentes productrices d'anticorps circulants ou cellulaires. Les antibiotiques s'attaquent au germe immunogène et ne peuvent être utilisés que dans certains cas privilégiés. Les anti-mitotiques détruisent toutes les cellules en division et en grande activité métabolique. Les cellules immunocompétentes sensibilisées qui présentent ces caractères, sont particulièrement réceptives à ces agents dont l'emploi comporte des inconvénients. Plus récemment, les sérums anti-lymphocytaires (SAL) ont été proposés pour leur plus grande spécificité d'action immunosuppressive et leur moindre cytotoxicité.

Le pouvoir immunodépresseur des SAL est connu depuis les travaux d'INDERBITZIN (64) qui, en 1956, montre qu'un sérum de lapin anti-thymocytes de cobaye négative la réaction tuberculinique chez cet animal. WOODRUFF (168) en 1963, obtient une prolongation importante de la survie des allogreffes cutanées chez le rat, avec un SAL hétérologue. Parmi les nombreux auteurs qui ont étudié le pouvoir inhibiteur des SAL sur l'immunité circulante, nous citerons le travail de JAMES (67) qui révèle l'efficacité d'un tel sérum sur la formation des anticorps anti-hématies de mouton chez le rat.

Enfin, en 1967, MORRIS (103) met en évidence les propriétés anti-inflammatoires d'un SAL de lapin anti-cobaye, sur la réaction phlogogène provoquée par l'injection intradermique de straphylocoques chez le cobaye.

Le pouvoir immunodépresseur des anti-mitotiques, est connu depuis 1921, date à laquelle HEKTOEN et CORPER (59) montrent qu'un agent alkylant, le gaz moutarde, déprime la formation des anticorps chez le rat et le chien. En 1952, MALMGREN (96) utilise le méthotrexate et supprime la réponse immune chez la souris. En 1958, SCHWARTZ (140) inhibe la formation des anticorps anti-BSA chez le lapin avec la 6-mercaptopurine (6-MP). Enfin, en 1967, SANTOS (138) montre le pouvoir immunodépresseur du 5-fluoro uracile (5-FU) chez l'homme et son inefficacité chez le rat et la souris.

Les propriétés anti-inflammatoires des anti-mitotiques sont connues depuis que PAGE (110 et 111) en 1962, a inhibé avec la 6-MP la réaction phlogogène induite par l'injection sous-cutanée d'ovalbumine chez le lapin. Depuis, de nombreux auteurs ont montré que le cyclophosphamide (4-112 et 144), le méthotrexate (87), l'azathioprine (4 et 87) et le chlorambucil (17) sont doués de propriétés anti-phlogistiques.

Ces dernières années, les rhumatismes humains, comme la polyarthrite rhumatoïde et certaines connectivites, sont traités par les médicaments immunosuppresseurs.

Parallèlement, des études expérimentales sont entreprises pour déterminer la valeur, les indications et les modalités de ces traitements.

Ces travaux ont porté essentiellement sur la polyarthrite du rat à adjuvant, décrite par PEARSON en 1956 (114). Cette maladie articulaire apparaît dans le cadre d'une maladie systémique vraisemblablement secondaire à une réaction d'hypersensibilité retardée (46-115-116-119 et 148). Cliniquement, la polyarthrite qui affecte essentiellement les extrémités distales, s'accompagne d'atteintes oculaires, génito-urinaires et cutanées. Elle présente ainsi des analogies avec la maladie rhumatoïde et le syndrome de FIESSINGER-LEROY-REITER.

Plus récemment, DUMONDE et GLYNN (41) en 1962, induisent chez le lapin, une monoarthrite immunologique auto-entretenu, dont les lésions de la synoviale sont identiques à celles de la maladie rhumatoïde.

Par ailleurs, en 1957, JASMIN (70) réalise la polyarthrite du rat à mycoplasma arthritidis. En 1961, DELBARRE (34) modifie la technique initiale et montre que la surrénalectomie n'est pas nécessaire à l'obtention de la maladie. En 1964, KAHAN (75 et 76) révèle l'importance des phénomènes immunologiques dans cette polyarthrite infectieuse.

Les travaux de la littérature sur les propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires des anti-mitotiques, utilisent le plus souvent, des doses très élevées, toxiques et nettement supérieures à celles pouvant être administrées chez l'homme.

Cependant, les expériences de WARD (154), KALLIOMÄKI, (77), GLEEN (53 et 54) et BROWN (24) qui utilisent divers anti-mitotiques pour traiter la polyarthrite à adjuvant, ont l'intérêt de montrer que les doses qui suppriment l'apparition de la maladie, sont des doses mortelles ; alors que celles qui atténuent l'intensité de l'atteinte articulaire sont en général bien tolérées.

De même, les expériences de CURREY et ZIFF (29-30 et 31) sur des rats atteints de polyarthrite à adjuvant ont l'intérêt de souligner, que le SAL exerce son effet anti-arthritique en agissant au stade de l'initiation de la réaction immunologique.

Dans notre travail, nous avons étudié divers sérums anti-lymphocytaires de lapin anti-rat préparés dans notre laboratoire et cinq anti-mitotiques : l'azathioprine, le méthotrexate, le 5-fluoro uracile, le chlorambucil et le cyclophosphamide.

Nous avons recherché les conséquences de ces traitements sur la polyarthrite infectieuse du rat à mycoplasma arthritidis et sur deux arthrites immunologiques : celle du lapin induite par un exsudat inflammatoire homologue et celle du rat provoquée par un adjuvant.

Nous avons tenté d'expliquer le mécanisme d'action anti-arthritique des cinq anti-mitotiques et des SAL, en dissociant leurs propriétés immunosuppressives de leurs propriétés anti-phlogistiques. Ces expériences sont réalisées avec des doses relativement faibles dont nous avons vérifié la toxicité générale et cellulaire.

Dans ce but, les SAL et les cinq anti-mitotiques, sont soumis à divers tests expérimentaux explorant la réaction inflammatoire non spécifique et les différents aspects de l'immunité. L'étude de la réaction phlogogène comporte chez le rat : l'œdème plantaire à la carragénine décrit par WINTER (164), le test du pellet de polyvinyl mis au point par GRINDLAY (57) et COSTE (28), enfin, le granulome à la carragénine, utilisé pour la première fois par ROBERTSON (132).

L'étude des différents aspects de l'immunité porte sur la formation des anticorps anti-hématies de mouton chez le rat, sur le temps de survie des allogreffes cutanées chez ce même animal, enfin, sur la réaction tuberculinique chez les rats atteints de polyarthrite à adjuvant.

2 - MATERIEL ET METHODE

2 – MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1. GÉNÉRALITÉS

2.1.1. Méthodologie statistique

En vue de l'analyse statistique des résultats, dans toutes les expériences, les animaux sont répartis au hasard à l'aide d'une table de nombres casualisés en lots témoins et traités.

Les comparaisons de moyennes sont faites à l'aide du test F de SNEDECOR ou du test t de STUDENT sur les différences couplées lorsque l'on a pu contrôler la normalité de la distribution des échantillons et l'homogénéité des variances. Dans le cas contraire, nous avons utilisé le test de rang non paramétrique de WILCOXON (Test W).

Les comparaisons de pourcentage sont calculées à l'aide du test Chi2 de PEARSON ou Chi2 corrigé de YATES.

2.1.2. Choix des animaux

- les lapins sont des albinos NEW ZEALAND provenant de l'élevage d'HARTENCOURT,
- les rats utilisés sont de deux souches :
 - 1 – des «SPRAGUE DAWLEY» provenant de l'élevage CHARLES RIVER FRANCE,
 - 2 – des «WISTAR», soit sélectionnés, originaires de la souche LEWIS de l'élevage de Gif-sur-Yvette, soit communs, fournis par les établissements ANIMALABO.

2.1.3 Mode d'administration des traitements

Dans tous les tests, à l'exception des greffes cutanées, les traitements sont administrés 6 jours par semaine. Dans l'immunité de transplantation, la date des premiers signes de rejet nécessitant un examen quotidien, les traitements sont donnés tous les jours de la semaine.

2.2. LES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES

En nous inspirant de la méthode de LEVEY et MEDAWAR (89 et 90), nous avons fabriqué trois types de SAL de lapin anti-rat :

- trois sérums anti-cellules lymphoïdes entières, fabriqués à partir de thymocytes (SAL-T), de cellules ganglionnaires (SAL-G) et de cellules spléniques (SAL-S),
- un sérum anti-membranes de thymocytes (SAL-MT),
- un sérum anti-nucléoprotéines de thymocytes (SAL-NT).

2.2.1. Les techniques de préparation des sérums

A – LES PRÉPARATIONS CELLULAIRES ET SUBCELLULAIRES

Les sérums sont préparés en immunisant des lapins, par des injections de cellules entières ou de subfractions de cellules lymphoïdes de rats. Les rats sont des mâles «SPRAGUE DAWLEY» pesant 200 ± 20 grammes. Les lapins sont des albinos mâles «NEW ZEALAND» pesant environ 2 kg 500.

- Les suspensions de cellules lymphoïdes entières sont obtenues à partir de broyats de thymus, de ganglions et de rates, prélevés stérilement dans du milieu Eagle L (Difco) contenant 3 ml/litre de glutamine à 5 %. Pour éliminer les débris, les fragments d'organes sont filtrés sur quatre gazes, puis centrifugés. On détermine le nombre de cellules vivantes par comptage avec du bleu trypan de 1 %.

– Les sérums préparés à partir de fractions subcellulaires sont obtenus en lysant des thymocytes préalablement lavés (tampon phosphate salin pH 7) en présence d’eau distillée à raison de 1 volume de culot cellulaire pour 10 volumes d’eau. La suspension cellulaire est homogénéisée à la turbine (MSE) pendant 25 à 30 minutes et soumise aux ultra-sons pendant 2 minutes (MSE type MT 20). Toutes ces manipulations sont faites à froid. Pour obtenir les nucléoprotéines, on précipite 3 ml de la suspension avec 1 ml de chlorure de sodium 0,6 M. Cette fraction est purifiée par solubilisation dans l’eau distillée et reprécipitation dans du sérum physiologique hypertonique. Le surnageant recueilli après la précipitation est soumis à une ultra centrifugation à 25.000tours/mn avec un rotor SW 25 (centrifugeuse SPINCO) pendant 60 minutes. Le culot obtenu contient les membranes cellulaires.

B – L’IMMUNISATION DES LAPINS

Les protocoles d’immunisation figurent dans le tableau N° 1.

TABLEAU N° 1
Modalités des immunisations des lapins.

	1ère injection		2ème injection	
SAL	Nb. de cellules vivantes/rat	Voie d’inj.	Nb. de cellules vivantes/rat	Voie d’inj.
SAL-T	de $4,3 \times 10^8$ à $1,5 \times 10^9$	I.V.	de $2,6 \times 10^8$ à $2,8 \times 10^9$	I.V.
SAL-G	de $1,5 \times 10^8$ à $1,0 \times 10^9$	I.V.	de $4,1 \times 10^8$ à $6,1 \times 10^8$	I.V.
SAL-S	de $5,5 \times 10^8$ à $1,3 \times 10^9$	I.V.	de $5,9 \times 10^8$ à $6,7 \times 10^8$	I.V.

SAL	Poids de fractions subcellulaires/rat	Voie d’inj.	Poids de fractions subcellulaires/rat	Voie d’inj.
SAL-MT	100 mg	I.D. ou I.V.	100 mg	I.P.
SAL-NT	200 mg	I.D. ou I.V.	200 mg	I.P.

C – L’OBTENTION DES SÉRUMS

Les lapins sont saignés à blanc, une semaine après la deuxième injection immunisante. Le sang est centrifugé deux fois. Les sérums filtrés sur millipore, sont décomplémentés au bain-marie à 56°C pendant 30 minutes. Pour éliminer les hémagglutinines, les SAL sont adsorbés trois fois sur des hématies de rats (5 ml de sérum pour 2 ml d’érythrocytes lavés). Le sérum normal de lapin est adsorbé une fois. Avant leur utilisation, les sérums sont à nouveau décomplémentés. Leur conservation est assurée à – 20°C.

2.2.2. Mode d’action des sérums anti-lymphocytaires (SAL)

Pour expliquer le mécanisme d’action immuno-suppressive des SAL, de nombreuses théories ont été proposées. Nous en mentionnerons quatre :

- la déplétion lymphocytaire ;
- la théorie de l’aveuglement : «Blind – Folding» ;
- l’activation stérile ;
- la compétition antigénique.

A – LA DÉPLÉTION LYMPHOCYTAIRE

DENMAN (39 et 40) et MARTIN (97)suggèrent que les SAL exercent une dépiétion préférentielle vis-à-vis des lymphocytes thymodépendants à vie longue. Le mécanisme de cette déplétion est une opsonisation à laquelle participe le complément et qui aboutit à l’élimination des lymphocytes par la rate et le foie.

B – LA THÉORIE DE L'AVEUGLEMENT («Blind-Folding»)

LEVEY et MEDAWAR (89) ont proposé cette théorie en 1966. Les lymphocytes recouverts par le SAL, seraient incapables de reconnaître les antigènes.

AGNEW (1) et BRENT (19) ont montré par des études en immunofluorescence que les SAL se fixent à la surface de certains lymphocytes circulants.

C – L'ACTIVATION STÉRILE

Les SAL provoquent «in vitro» la transformation blastique des lymphocytes en culture. Le même phénomène se produit «in vivo» ; l'injection de SAL est suivie de l'apparition de cellules lymphoblastiques dans le sang circulant et d'une augmentation de l'incorporation de la thymidine 3H dans les organes lymphoïdes (8). Les lymphocytes ainsi stimulés par les SAL, seraient incapables d'être activés par un antigène. On doit noter qu'un tel mécanisme a été proposé pour expliquer l'action immunodépressive de la phytohémagglutinine (PHA).

D – LA COMPÉTITION ANTIGÉNIQUE

L'hypothèse d'un pouvoir antigénique puissant des SAL est confirmée «In vivo» et «in vitro» par KAYIBANDA (80-81) sur la souris immunisée par des globules rouges de mouton et sur des cultures de cellules spléniques de souris. Les lymphocytes occupés à produire des anticorps anti-SAL, ne seraient pas capables de répondre simultanément à une autre stimulation antigénique.

Nous concluons avec BACH (8) :

«parmi les mécanismes d'action des SAL, ci-dessus proposés, les seuls compatibles avec tous les résultats expérimentaux sont les deux premiers, la déplétion sélective d'une population de lymphocytes immuno-compétents avec élimination dans le foie et le «blind-folding», dans la mesure où l'on admet que ce «blind-folding», sans doute avec la participation du complément, précède la déplétion, c'est-à-dire que certains lymphocytes sont dans un premier temps inactivés avant d'être éliminés par le foie».

2.2.3. Détermination de l'activité «in vitro»

Nous avons utilisé trois méthodes qui mettent en évidence :

- le pouvoir lymphoagglutinant,
- le pouvoir lymphostimulant,
- le pouvoir inhibiteur de la migration des thymocytes.

A – LA LYMPHOAGGLUTINATION

Ce test d'activité «in vitro» du SAL est réalisé par une mise en contact de ce sérum avec une suspension cellulaire lymphoïde pendant 30 minutes, au bain marie à 37°C.

Les suspensions cellulaires sont obtenues à partir de broyats de rate, thymus et ganglions dans du milieu de Eagle, contenant de la glutamine. La réaction est réalisée en tube à hémolyse. A 0,1 ml de suspension cellulaire, contenant 20×10^6 cellules vivantes, sont additionnés 0,2 ml de SAL dilué de 1/2 en 1/2, dans du sérum physiologique, à partir de la concentration 1/4 jusqu'au 1/1024. La lymphoagglutination est lue à l'œil nu. Pour chaque suspension cellulaire, l'absence d'agglutination non spécifique est vérifiée par un tube témoin. La dernière dilution qui donne une agglutination nette, est considérée comme taux de lymphoagglutination.

B – L'ACTION DES SAL SUR LES LYMPHOCYTES EN CULTURE : LA LYMPHOSTIMULATION

La culture de lymphocytes chez le rat, est réalisée en deux étapes :

- obtention des lymphocytes ;
- mise en culture.

L'obtention des lymphocytes :

Les lymphocytes sont obtenus après sédimentation **sans filtration**, du sang prélevé par ponction cardiaque sur calciparine (12.500 U/10 ml). Le sang du rat sédimentant très lentement, 1 volume de plasmagel est additionné à 2,5 volumes de sang pour accélérer la vitesse.

Après un séjour de 60 minutes à l'étuve à 37°C, les lymphocytes recueillis dans le surnageant, sont lavés une à deux fois dans du milieu de Eagle, enrichi avec 20 % de sérum de veau foetal inactivé. Le plasmagel et le sérum sont éliminés par centrifugation (5 minutes à 1000 tours/minute). Les cellules lymphoïdes sont remises en suspension dans du milieu de Eagle

enrichi, contenant 3 ml/litre de glutamine à 5 %. On ajoute 100 unités de pénicilline et 50 gammas de streptomycine par millilitre. 1 à 2 x 10⁶ cellules vivantes/ml sont nécessaires pour réaliser la culture.

La mise en culture se fait à l'étuve à 37°C. Les tubes contiennent 3 ml de suspension cellulaire et 0,1 ml de SAL ou PHA (PHA M Difco à la dilution de 1/15). Ils sont bouchés hermétiquement et inclinés à 120°.

Trois et cinq jours plus tard, on centrifuge les tubes à faible vitesse, et le culot est étalé sur lame. Le pourcentage des cellules transformées est lu au microscope après coloration au May-Grundwald Giemsa.

C – L'ÉTUDE DU POUVOIR INHIBITEUR DES SAL SUR LA MIGRATION DES THYMOCYTES DE RATS

Cette méthode nécessite trois étapes :

La préparation de la suspension de thymocytes :

Après prélèvement stérile, les thymus de rats «SPRAGUE DAWLEY», âgés de 7 semaines, sont fragmentés dans du milieu de Eagle enrichi avec 50 % de veau foetal. Les fragments sont broyés sur un tamis recouvert de quatre couches de gaze. La suspension cellulaire obtenue, est lavée trois fois dans du milieu de Eagle contenant 100 U de pénicilline et 50 gammas de streptomycine par millilitre. Les cellules sont remises en suspension à une concentration d'environ 5 x 10⁷ cellules/ml. Cette suspension est ensuite placée dans des tubes capillaires qui sont centrifugés à 1 500 tours/minute pendant 3 minutes. Les tubes sont ensuite sectionnés à la hauteur du culot cellulaire.

La viabilité des thymocytes est contrôlée par l'épreuve au bleu trypan.

La mise en cellules de migration

Deux tubes sont introduits stérilement, dans une cellule à migration. Certaines cellules contiennent uniquement du milieu de Eagle et constituent le groupe témoin. Les autres contiennent en outre, du SAL dilué au 1/10, 1/100, 1/500 et 1/1000. Ces cellules sont ensuite placées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

La détermination de l'indice de migration

La surface de migration des thymocytes est mesurée sur papier calque quadrillé après projection sur écran de microscope. L'indice de migration (IM) est calculé par le rapport :

$$IM = \frac{\text{Surface de migration moyenne en présence de SAL}}{\text{Surface de migration moyenne sans SAL}}$$

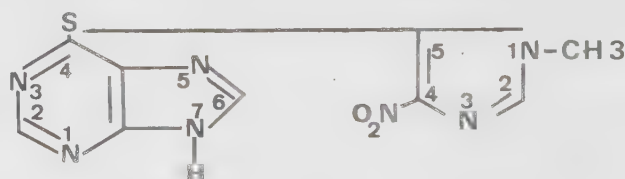
2.3. LES ANTI-MITOTIQUES

2.3.1. Les structures chimiques

Nous avons étudié cinq anti-mitotiques :

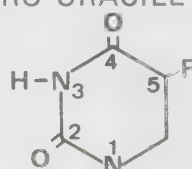
– UN ANALOGUE DE STRUCTURE DES BASES PURIQUES

L'AZATHIOPRINE ou 1-méthyl, 4-nitro, 5-imidazolyl mercapto-purine.



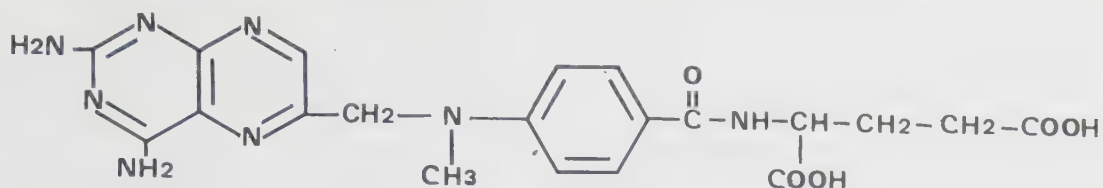
– UN ANALOGUE DE STRUCTURE DES BASES PYRIMIDIQUES

Le 5-FLUORO URACILE



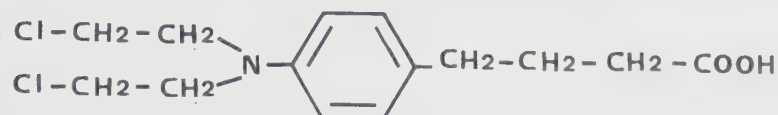
- UN ANTAGONISTE DE L'ACIDE FOLINIQUE

Le METHOTREXATE ou acide 4-amino N 10 méthyl, ptéroyl glutamique

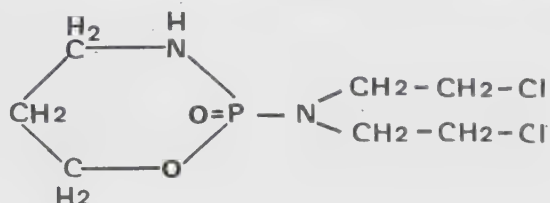


- DEUX ALKYLANTS

Le CHLORAMBUCIL ou acide p bis (chloro-2-éthylamino) phényl butyrique.



Le CYCLOPHOSPHAMIDE ou monohydrate de N, N bis (bêta-chloro-éthyl) N' O propylène phosphoramide.



2.3.2. Le mécanisme d'action des anti-mitotiques

A - L'AZATHIOPRINE

«In vivo» et «in vitro», les groupes sulfhydryl scindent l'azathioprine en 6-mercaptopurine (6-MP) et en un groupe nitro-méthyl imidazol (20 - 42 - 43 - 44 - 45).

La 6-MP ne s'incorpore pas dans les acides nucléiques, mais intervient dans leur synthèse par un double mécanisme.

La 6-MP se convertit en acide thio-inosinique et elle exerce ainsi une action anti-métabolique en supprimant la synthèse de l'acide inosinique, précurseur des acides adénylique, guanylique du RNA, du DNA et des co-enzymes à base de nucléotides (156).

La 6-MP inhibe la synthèse de l'acide inosinique à partir de ses précurseurs (effet «pseudo-feedback») qui sont : le glycolle, l'acide formique, le CO₂ et les groupes -NH₂ de l'acide aspartique et de la glutamine (27).

B - LE 5-FLUORO URACILE

Le 5-FU inhibe la biosynthèse du RNA et des protéines en s'incorporant dans l'acide ribonucléique. Il inhibe la formation du D.N.A. en altérant la synthèse de la thymidylate synthétase (48 et 58).

C - LE METHOTREXATE

Le MTX, antagoniste de l'acide folique, inhibe les synthèses du noyau purique et de l'acide thymidylique (15).

Cet anti-mitotique inhibe la dihydrofolate réductase qui transforme l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique (THF). Le THF est nécessaire à la formation des Carbones 2 et 8 du noyau purique et permet la transformation de l'acide désoxyuridylique en acide thymidylique. Cette dernière étape est particulièrement sensible au MTX et explique son action privilégiée sur les cellules en division. Par ailleurs, le THF est nécessaire à la synthèse de plusieurs acides aminés, comme par exemple, la méthionine à partir de l'homocystéine et le glycolle à partir de la sérine.

D — LES ALKYLANTS

Les alkylants possèdent une importante réactivité chimique grâce à leurs centres nucléophiles, ce qui explique la complexité de leur activité (157)

- Ils dépurinisent le DNA en se fixant sur l'azote 7 de la guanine. Cette fixation provoque soit une rupture de la chaîne de DNA, soit l'altération d'un codon lorsque la chaîne alkylée ne se rompt pas, soit l'absence de mitose lorsque l'alkylation porte sur la guanine de chacune des chaînes d'un DNA bicaténaire.
- Ils inhibent la synthèse du DNA en diminuant l'activité de la DNA nucléotidyl-transférase (157). Ce mécanisme d'action a été étudié en particulier avec le cyclophosphamide.
- Les alkylants se combinent avec les groupes «amino», «sulfhydryl» et «sulfide» ainsi que les anions organiques et inorganiques (133).

2.3.3. Les préparations utilisées

Chez le rat, l'azathioprine et le chlorambucil sont administrés per os, sous forme d'une suspension aqueuse contenant 1 goutte de tween 80 pour 25 ml.

Le cyclophosphamide, le méthotrexate et le 5-fluoro uracile sont administrés sous forme de solution aqueuse injectée par tubage gastrique pour le MTX, par voie S/C pour le 5-FU et par voie S/C ou I.P. pour le C.P.P.

Les témoins reçoivent l'excipient, per os, c'est-à-dire une solution aqueuse de tween 80 à la concentration de 1 goutte pour 25 ml. Les volumes injectés sont de 0,25 ml pour 100 grammes de poids corporel de rat.

Chez les lapins, le cyclophosphamide en solution aqueuse, est injecté par voie I.V. et I.M.

2.4. LA POLYARTHRITE A ADJUVANT

2.4.1. Induction de la maladie

L'induction de cette maladie chez le rat est réalisée en deux étapes :

A — PRÉPARATION DE L'ADJUVANT

6 ou 9 mg de mycobactérium tuberculosis tués et séchés (H 37 Ra Difco) sont broyés au mortier et émulsionnés à 1 ml d'adjuvant contenant : 6 parts d'huile de vaseline du CODEX, 4 parts d'eau distillée et 1 part de tween 80.

L'homogénéisation est assurée par passages à la turbine (MSE) pendant deux fois 90 minutes et par stérilisation durant 30 minutes à l'autoclave (120°C).

B — RÉALISATION DE LA POLYARTHRITE

Cette polyarthrite est provoquée chez le rat mâle «SPRAGUE DAWLEY» âgé de 9 semaines, par l'injection de 0,6 mg de mycobactérium dans le coussinet plantaire.

Nous avons étudié cette maladie après une deuxième stimulation antigénique 30 jours après la première. Dans ce cas, les deux injections immunisantes, sont faites au niveau de la racine de la queue et contiennent chacune 0,9 mg de mycobactérium par rat. Toutes les manipulations sont exécutées stérilement. Pour maintenir une bonne homogénéisation, le flacon contenant l'adjuvant est placé sur un agitateur magnétique chauffant.

Nous avons étudié, chez les rats polyarthritiques, le pouvoir antigénique du mycobactérium tuberculosis, d'une part, par la réaction d'immunité cellulaire à la tuberculine, d'autre part, en recherchant des anticorps circulants «anti-mycobactériens».

2.4.2. Test à la tuberculine

Les rats reçoivent par voie I.D, sur le flanc rasé, 0,1 ml de tuberculine brute de l'Institut Pasteur, diluée au 1/100 et sur l'autre flanc, 0,1 ml de sérum physiologique. La réaction est appréciée 24 et 48 heures plus tard, en mesurant les diamètres maximum et minimum de l'induration. Les calculs portent sur la moyenne des deux diamètres.

A – SUR LA POLYARTHRITE APRES UNE STIMULATION ANTIGÉNIQUE

La réaction cutanée est faite selon deux protocoles :

- soit sous traitement ou 2 jours après son arrêt, c'est-à-dire entre le 12ème et le 18ème jours après l'injection de l'adjuvant,
- soit 8 ou 12 jours après la dernière injection des anti-mitotiques ou de SAL.

B – SUR LA POLYARTHRITE APRES DEUX STIMULATIONS ANTIGÉNIQUES

Le test est réalisé sous traitement immunosuppresseur, c'est-à-dire 5 ou 10 jours après la deuxième stimulation antigénique.

2.4.3. Mise en évidence d'éventuels anticorps circulants

La mise en évidence d'éventuels anticorps circulants est réalisée en nous inspirant des travaux de LIND (92). Nous avons utilisé la méthode de double diffusion sur gel décrite par OUCHTERLONY (109).

La diffusion est réalisée dans des boîtes de PETRI contenant 1,5 % de gel d'agar (Difco) préparé dans du chlorure de sodium à 0,9 % additionné de tampon phosphate de 0,02 M (pH 7,0) et de 1/10.000 de merthiolate.

La gélose est creusée de trois cavités, l'une contient 0,1 ml de sérum de rat polyarthritique dilué au 1/100, les deux autres contiennent soit 0,1 ml de solution de tuberculine à 1 % de l'Institut Pasteur, soit 0,1 ml d'une suspension aqueuse de Mycobactérium Tuberculosis H 37 Ra (difco) à la concentration de 1 mg/ml, autoclavée trois fois pendant 20 minutes à 120°C.

2.4.4. Étude des modifications hématologiques

L'étude des modifications hématologiques dans le sang et la moëlle, induites par la polyarthrite comporte : une vitesse de sédimentation, un hémogramme, et un myélogramme.

Ces examens sont pratiqués avant et 16 ou 30 jours après l'injection de l'adjuvant selon les traitements essayés.

La VITESSE DE SÉDIMENTATION est obtenue par la micro-méthode de KOWARSKI, après prélèvement du sang à la racine de la queue.

L'HÉMOGRAMME comprend : un micro-hématocrite, une numération différentielle des leucocytes et une formule leucocytaire.

Le MYELOGRAMME est obtenu après prélèvement de la moëlle tibiale en présence de E.D.T.A. à 3 % (éthylène diamine-tétra-acétique).

L'hémogramme et le myélogramme des rats «SPRAGUE DAWLEY», normaux âgés de 9 semaines, figurent dans les planches hors texte N° I et N° II.

2.4.5. Mode d'administration des traitements immunosuppresseurs

A – LES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES

Les sérums sont toujours injectés par voie I.P. Les témoins reçoivent du sérum physiologique dans les mêmes conditions.

L'étude des SAL sur la polyarthrite après une stimulation antigénique comporte deux expériences :

- la première porte sur 5 lots de 10 rats : témoin et traités par les SAL-T, SAL-G, SAL-S et SN.
- la seconde porte sur 3 lots de 10 rats : témoin, SAL-T et SAL-MT.

Les traitements sont commencés à JO, jour de l'injection de l'adjuvant et poursuivis à J2, J5, J9 et J12. La quantité totale injectée est de 3 ml répartis en 1 ml à JO et 0,5 ml les autres jours.

L'étude des SAL sur la polyarthrite après deux stimulations antigéniques porte sur 3 lots de 15 rats : témoin et traités par le SAL-T et SN. Les traitements sont commencés à J30, jour de la deuxième immunisation et sont poursuivis jusqu'à J37. La quantité totale injectée est de 4 ml répartis en 1 ml à J30 et 0,5 ml à J31, 33, 34, 35, 36 et J37.

B – LES ANTI-MITOTIQUES

Sur la polyarthrite après une stimulation antigénique, l'étude des anti-mitotiques comporte deux expériences :

- la première porte sur 4 lots de 15 rats : témoin et traités par l'azathioprine, le chlorambucil et le cyclophosphamide ;
- la seconde sur 3 lots de 15 rats : témoin et traités par le MTX et 5-FU.

Les traitements sont commencés à JO, jour de l'injection de l'adjuvant et poursuivis chaque jour jusqu'à J15 ou J16.

La posologie varie d'un rat et d'un jour à l'autre, selon les variations du poids corporel et de l'état général des animaux.

Les protocoles d'administration figurent dans le tableau N° 2.

TABLEAU N° 2 – Polyarthrite après une stimulation antigénique, traitée par les anti-mitotiques

Traitements 15 rats	Modalité d'administration			
	Dose en mg/kg Nombre d'injections		Dose moyenne/jour en mg/kg	Voie
AZA . . .	Dose	Inj.	28,0	per os
	40	5		
	20	8		
CHLO . . .	20	4	12,0	per os
	10	6		
	5	3		
C.P.P.	10	13	10,0	S/C
MTX	0,2	3	0,1	per os
	0,07	11		
5-FU	12,5	14	12,5	S/C

Sur la polyarthrite après deux stimulations antigéniques :

L'expérience porte sur 3 lots de 15 rats. Seuls le chlorambucil et le cyclophosphamide sont testés. Leur administration commence à partir de J31 (jour de la deuxième stimulation antigénique) et est poursuivie jusqu'à J47. Les témoins reçoivent l'excipient par voie orale.

Les protocoles d'administration figurent dans le tableau N° 3.

TABLEAU N° 3 – Polyarthrite après deux stimulations antigéniques, traitée par les anti-mitotiques

Traitements 15 rats	Modalité d'administration			
	Dose en mg/kg Nombre d'injections		Dose moyenne/jour en mg/kg	Voie
CHLO . . .	Dose	Inj.	6,8	per os
	15	2		
	5	9		
C.P.P.	10	15	10,0	S/C

2.5. LA POLYARTHRITE A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS

L'obtention de cette polyarthrite nécessite trois étapes. Les rats utilisés sont des WISTAR-LEWIS, femelles pesant 200 ± 20 grammes.

2.5.1. CONSERVATION DE LA TUMEUR

Le lymphosarcome de MURPHY est un milieu de culture privilégié pour le P.P.L.O. (peri-pneumonia-like-organisms), germe responsable de la maladie.

Des fragments de tumeur sont réimplantés stérilement tous les quinze jours, par voie sous-cutanée, dans la région cervico-dorsale des rats.

2.5.2. Préparation de l'exsudat arthrogène

Cet exsudat est obtenu en broyant des fragments de tumeur. Le broyat est mis en suspension dans du sérum physiologique additionné de pénicilline et de colimycine à la concentration de 100.000 U/ml. Après décantation de 4°C pendant 15 minutes, 2 ml de surnageant et 20 ml d'air stérilisé sont injectés simultanément sous la peau dorsale de rats normaux.

Une semaine plus tard, un liquide citrin est retiré par ponction du pneumoderme. Après centrifugation à 2.500 tours par minute, pendant 10 minutes, l'exsudat est prêt à l'emploi.

2.5.3. Induction de la polyarthrite

L'exsudat est utilisé de préférence frais, mais il garde son pouvoir arthrogène durant plusieurs semaines à -20°C. 0,5 ml d'exsudat additionnés à 0,5 ml de dextran à 6 % (CLIN COMAR) sont injectés simultanément à d'autres rats, par voie intra-péritonéale.

2.5.5. Mode d'administration des traitements immunosuppresseurs

Cette étude comporte deux expériences :

La première sur 20 rats répartis en 4 lots de 5 animaux :

Témoin et traités par l'azathioprine, le chlorambucil et le cyclophosphamide.

La deuxième sur 30 rats répartis en 3 lots de 10 animaux :

Témoin et traités par le SAL-T et le SN.

Dans les deux expériences, les traitements sont commencés à partir du jour de l'injection de l'exsudat arthrogène (JO). Les protocoles d'administration figurent dans le tableau n° 4.

Tableau N° 4
Polyarthrite à Mycoplasma Arthritis traitée par des immunosuppresseurs.

Traitements	Nbre de rats	Modalité d'administration			
		Dose en mg/kg Nb. injections		Dose moyenne/j en mg/kg	Voie
AZA . . .	5	Dose 40	Inj. 6	40	per os
CHLO . . .	5	10	6	10	per os
C.P.P.	5	10	6	10	S/C
SAL-T	10	1 ml 0,5 ml	J0 J3	Dose totale 2,5 ml	I.P.
SN	10	0,5 ml 0,5 ml	J6 J9	2,5 ml	I.P.

2.6. LA MONOARTHRITE DU LAPIN INDUITE PAR UN EXSUDAT INFLAMMATOIRE HOMOLOGUE

Les lapins utilisés sont des mâles albinos, NEW ZEALAND pesant 2 kg à 2kg 500.

2.6.1. Production de l'exsudat homologue

L'obtention de cet exsudat nécessite deux étapes :

A – CRÉATION D'UN PNEUMODERME

Le pneumoderme est obtenu par des injections, S/C, quotidiennes au niveau de la région cervico-dorsale de 50 ml d'air stérile pendant 4 jours consécutifs.

B – PRODUCTION DE L'EXSUDAT

2 ml d'une solution stérile d'huile de croton à 1 % dans de l'huile d'olive, sont injectés dans le pneumoderme.

Quinze jours plus tard, les lapins sont sacrifiés, et on prélève en bloc la poche et son contenu qui sont homogénéisés à l'aide d'une turbine (MSE) et d'un appareil à ultra-sons (MSE type MT 20 pendant 2 minutes).

L'exsudat obtenu contient 50 g/litre de protéines. Additionné de 500 U de pénicilline/ml et de 1.000 U de colimycine/ml, cet exsudat inflammatoire est conservé à -20°C .

2.6.2. Immunisation des lapins

Les lapins sont immunisés deux fois à 7 semaines d'intervalle, par injection I.D., dans la région cervicale de 10 mg «d'exsudat protéine» soit 0,2 ml d'exsudat dans 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Chaque immunisation est contrôlée par l'injection I.D. de 0,2 ml d'exsudat immunogène aux concentrations de 5, 20 et 500 microgrammes/ml. Les tests cutanés sont réalisés six semaines après la première immunisation et cinq semaines après la deuxième.

2.6.3. Déclenchement de l'arthrite

15 semaines après la deuxième immunisation, les deux lapins du groupe témoin reçoivent stérilement dans l'articulation des deux genoux, de l'huile de croton à la concentration de 4 ‰ dans un mélange à parties égales de sérum physiologique et d'huile d'olive.

Les six lapins du groupe expérimental reçoivent dans les mêmes conditions, 0,2 ml d'exsudat homologue mélangés à 0,8 ml de sérum physiologique.

2.6.4. Dissection des articulations

15 jours après l'injection I.A., les lapins sont sacrifiés, les genoux sont disséqués stérilement. Le liquide synovial prélevé est examiné sur le plan cytot bactériologique. La synoviale fémoro-tibiale est excisée en vue de l'examen histologique.

2.6.5. Histologie

Après fixation des franges synoviales dans du BOUIN, les lames sont colorées à l'hématéine éosine pour l'étude topographique. Nous avons utilisé l'acide périodique -Schiff (APS) et la méthode de Feulgen-Rosenbeck, comme colorations spécifiques.

2.6.6. Modalité du traitement par le cyclophosphamide

Les 8 lapins immunisés sont répartis en deux groupes de 4 animaux :

- le groupe témoin reçoit du sérum physiologique par voie I.V. et I.M.
- le deuxième groupe est traité par le cyclophosphamide, administré dans les mêmes conditions. Le traitement est commencé 11 semaines après la deuxième immunisation. Les quantités de C.P.P. sont administrées en fonction des données du poids corporel de chaque animal et de l'examen hématologique comportant un micro-hématocrite, une numération des plaquettes, des leucocytes totaux et d'une formule leucocytaire. Le cyclophosphamide est injecté pendant 29 jours avant l'injection I.A. et pendant 1 semaine après. Les doses injectées figurent dans le tableau N° 5.

Tableau N° 5
Modalités du traitement par le cyclophosphamide

N° lapin	C.P.P. avant l'injection I.A. d'exsudat	C.P.P. après l'injection I.A. d'exsudat	C.P.P. Quantité totale injectée
2	660 mg/kg	140 mg/kg	800 mg/kg
5	500 mg/kg	140 mg/kg	640 mg/kg
6	440 mg/kg	80 mg/kg	520 mg/kg
7	500 mg/kg	120 mg/kg	620 mg/kg

2.7. ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ CIRCULANTE : LA FORMATION DES ANTICORPS ANTI-HÉMATIES DE MOUTON CHEZ LE RAT

Les animaux utilisés sont des rats mâles ou femelles de la souche «SPRAGUE DAWLEY» pesant 200 à 300 grammes. La recherche d'anticorps anti-hématies de mouton comporte deux étapes :

- l'immunisation des rats
- la réaction d'hémagglutination.

2.7.1. Immunisation des rats

Les rats sont immunisés au jour JO, par l'injection I.P., de 1 ml de suspension d'hématies de mouton à 10 %, préalablement lavées dans du sérum physiologique.

2.7.2. Test d'hémagglutination

Le test d'hémagglutination est réalisé à JO, J7, J14 et J21. 1 ml de sang est prélevé au niveau de la queue du rat. Après coagulation et centrifugation, on obtient 0,4 ml de sérum que l'on dilue au 1/5 dans du sérum physiologique. Ce sérum est décomplémenté. L'hémagglutination est appréciée par un test sur tubes. Le sérum est dilué de 1/2 en 1/2, de 1/5 à 1/1.280. Chaque tube contient 0,2 ml de sérum auquel est ajouté 0,1 ml d'hématies de mouton à 1 %. Les tubes sont d'abord placés pendant 1 heure, au bain-marie à 37°C, puis pendant 18 heures à 4°C. La lecture est faite à l'œil nu. Le dernier tube dans lequel on constate une agglutination, fixe le taux d'hémagglutination. Nous avons dosé les anticorps après une deuxième immunisation, réalisée 14 jours après la première. Les réactions d'hémagglutination sont observées à J14, J21, J28 et J35.

2.7.3. Détermination de la nature des anticorps

Pour déterminer la nature des immunes globulines du rat, responsables de l'hémagglutination, nous avons utilisé le test du 2-mercapto-éthanol (2 ME). Schématiquement, on peut considérer que les immunes globulines sensibles au 2 ME sont des IgM (19 S), que celles résistantes au 2 ME sont des 7 S et dans le cas présent, essentiellement des IgG.

TECHNIQUE : Le sérum des rats immunisés est dilué de 1/2 en 1/2 dans un tampon phosphate à pH 7,2. 0,5 ml de ce sérum sont additionnés de 0,5 ml de 2 ME (0,2 M). Le mélange est incubé à 37°C, pendant 1 heure, puis à la température de + 4°C pendant 18 heures. Le taux d'hémagglutination est déterminé avant et après l'addition de 2 ME.

2.7.4. Mode d'administration des traitements immunosuppresseurs

A – L'ÉTUDE DE LA RÉPONSE PRIMAIRE

comporte trois expériences :

- la **première** porte sur 4 lots de 10 rats : témoin et animaux traités par l'azathioprine, le chlorambucil, et le cyclophosphamide.
- la **deuxième** porte sur 5 lots de 10 rats : témoin et traités par le 5-FU, le SAL-MT, le SAL-NT et le SN.
- la **troisième** porte sur 3 lots de 10 rats : témoin et traités par le MTX et le SAL-T.

Les SAL et le SN sont administrés par voie I.P., à la dose de 1 ml à JO (jour de l'immunisation) et 0,5 ml à J1, J2, J3, J4 et J5. Les protocoles d'administration des anti-mitotiques figurent dans le tableau N° 6.

Les témoins reçoivent du sérum physiologique ou de l'excipient, dans les mêmes conditions.

B – L'ÉTUDE DE LA RÉPONSE SECONDAIRE

porte sur 50 rats répartis en 5 lots de 10 animaux : témoin et traités par le chlorambucil, le cyclophosphamide, l'azathioprine et le MTX.

Les traitements sont commencés à J14 (jour de la deuxième stimulation) et poursuivis chaque jour jusqu'à J20, soit 6 injections au total.

Les protocoles d'administration figurent dans le tableau N° 6.

TABLEAU N° 6

Immunité circulante

Modalités du traitement immunosuppresseur sous 1er et 2ème «set»

Traitements 10 rats	Modalité d'administration			
	Dose en mg/kg Nb. injections		Dose moyenne/J en mg/kg	Voie
AZA . . .	Dose 50,0	Inj. 6	50,0	per os
CHLO . . .	20,0 10,0	4 2	17,0	per os
C.P.P.	10,0	6	10,0	I. P.
MTX	0,2	6	0,2	per os
5-FU*	12,5	6	12,5	S/C

* le 5-FU n'est testé que sous premier «set».

2.8 LES ALLOGREFFES CUTANÉES CHEZ LE RAT

2.8.1 Le choix des animaux

Les **RECEVEURS** sont des rats mâles «SPRAGUE DAWLEY» âgés de 7 à 8 semaines au moment de la première transplantation.

Les **DONNEURS** sont des rats «WISTAR» d'origine «LEWIS» de même âge et de même sexe.

2.8.2. Technique de la greffe

Toutes les manipulations sont exécutées stérilement en particulier la peau est désinfectée à l'alcool.

A – ANESTHÉSIE DES RATS

Les animaux sont anesthésiés au pentobarbital sodique (ABBOTT) à 6 %, à raison de 0,050 à 0,075 ml pour 100 grammes de poids corporel, par voie I.P.

B – PRÉPARATION DU GREFFON

Un lambeau de peau de 3 cm de diamètre est prélevé au niveau de l'abdomen, préalablement rasé. Le tissu cellulaire sous-cutané, disséqué du derme, est éliminé et le greffon est conservé dans du sérum physiologique.

C – PRÉPARATION DU LIT DE LA GREFFE

Après rasage du dos du receveur, un cercle cutané de 4 cm de diamètre est découpé, soit dans la région cervico-dorsale, soit en regard du rachis lombo-sacré. Le fascia recouvrant l'aponévrose musculaire est excisé, sans endommager le réseau vasculaire sus et sous-jacent.

D – MISE EN PLACE DU GREFFON

L'implant est encastré dans la brèche cutanée. Il est amarré au plan musculaire profond par du fil de nylon tressé N°00, et la suture cutanée est réalisée point par point. Pour assurer une bonne contention du greffon, un tampon cylindrique est fixé sur le dos du rat par des points cutanés.

2.8.3. Les modalités des greffes

Nous avons étudié trois types d'expériences :

A – UNE ÉTUDE DE LA SURVIE DU GREFFON DE PREMIERE TRANSPLANTATION

Dans ce cas, le siège de l'implant est la région cervico-dorsale.

B – UNE ÉTUDE DE LA SURVIE DU GREFFON DE DEUXIEME TRANSPLANTATION, 15 OU 30 JOURS APRES LA PREMIERE, SOUS TRAITEMENT IMMUNOSUPPESSEUR

Dans ce cas, le siège du premier implant est la zone lombosacrée, celui du deuxième «set», la région cervico-dorsale.

C – UNE ÉTUDE DE LA SURVIE DU GREFFON DE DEUXIEME TRANSPLANTATION APRES ARRET DU TRAITEMENT IMMUNOSUPPESSEUR: POUR METTRE EN ÉVIDENCE UN ÉTAT DE TOLÉ- RANCE IMMUNOLOGIQUE

Dans ce cas, la première greffe est mise en place dans la région cervico-dorsale, la deuxième dans la zone lombo-sacrée, 19 jours après la première.

2.8.4. Les modalités des traitements immunosuppresseurs

A – LES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES

Dans toutes les expériences, les sérums sont injectés par voie I.P. Les témoins reçoivent du sérum physiologique dans les mêmes conditions.

Sur les greffes de 1er «set» sont testés : les SAL-T, SAL-MT, SAL-NT et le SN.

Les protocoles d'administration figurent dans le tableau N° 7.

TABLEAU N° 7

Les modalités d'administration des SAL. Greffes de 1er «SET»

Traitements	Nbre de rats	Modalité d'administration		
		Dose en ml/j	Jours des Injections	Dose Totale
SAL-T	6	1,0 0,5	J0, J2, J5 J7, J9	4 ml
	6	1,0 0,5	J-3, J-2, J-1, J0, J2, J5, J7, J9	7 ml
SAL-MT	5	1,0	J0, J2, J5	3 ml
	5	1,0 0,5	J0, J2, J5, J7, J9,	4 ml
	5	1,0 0,5	J0, J2, J7 J5, J9	4ml
SAL-NT	5	1,0 0,5	J0, J2, J7, J5, J9	4 ml
SN	4	1,0 0,5	J0, J2, J5 J7, J9	4 ml
	2	1,0 0,5	J0, J2, J7 J5, J9	4 ml

Sur les greffes de 2ème «SET» :

La deuxième transplantation est réalisée à J0, 15 jours après la première. Les traitements sont commencés le jour de la deuxième stimulation. Les protocoles figurent dans le tableau N°8.

TABLEAU N° 8

Les modalités d'administration des SAL. Greffes de 2ème «SET»

Traitements	Nb. de rats	Modalité d'administration		
		Dose en ml/j	Jours des Injections	Dose Totale
SAL-T	4	1,0 0,5	J0, J2, J4,	2 ml
	5	1,0 0,5	J0, J1, J2 J4, 5, 6, 7, J8, 9	6 ml
SAL-MT	5	1,0 0,5	J0, J2, J4,	2 ml
SAL-NT	5	1,0 0,5	J0, J2, J4	2 ml
SN	5	1,0 0,5	J0, J2, J4,	2 ml
	5	1,0 0,5	J0, J1, J2, J4, 5, 6, 7,	5 ml

B – LES ANTI-MITOTIQUES

Sur les greffes de 1er «SET»

L’azathioprine, le chlorambucil, le cyclophosphamide, le 5-FU et le MTX sont administrés à partir du jour de la transplantation. Le traitement est poursuivi pendant 15 jours au maximum. Il est cependant interrompu dès le rejet de la greffe. Les témoins reçoivent l’excipient par voie orale. Les protocoles d’administration figurent dans le tableau N° 9.

TABLEAU N° 9

Modalité d’administration des anti-mitotiques. Greffes de 1er «SET»

Traitements	Nb. de rats	Modalité d’administration			
		Dose en mg/kg/j.	Nb. inj.	Dose moyenne en mg/kg	Voie
AZA ...	5	20,0	de 10 à 14	20,0	per os
CHLO...	10	5,0 et 10,0	11 à 15	8,0	per os
C.P.P.	10	10,0	10 à 16	10,0	S/C
5-FU	6	12,5	10 à 12	12,5	S/C
MTX	5	0,1	7 à 9	0,1	per os

Sur les greffes de 2ème «SET»

réalisées à JO, c’est-à-dire 15 jours ou 30 jours après le premier transplant. Le traitement est commencé à partir de la deuxième stimulation, il est poursuivi pendant 15 jours au maximum, mais il est interrompu dès le rejet du greffon. Les protocoles d’administration figurent dans le tableau N° 10.

TABLEAU N° 10

Modalité d’administration des anti-mitotiques. Greffes de 2ème «SET»

Traitements	Nb. de rats	Modalité d’administration			
		Dose en mg/kg/j.	Nb. inj.	Dose moyenne en mg/kg	Voie
CHLO ...	6	6 et 12	de 7 à 14	8	per os
C.P.P.	6	10	de 7 à 12	10	S/C

Sur les greffes de 2ème «SET»,

réalisées à JO, c’est-à-dire 20 jours après la première transplantation. Le traitement est commencé le jour de la première stimulation et est poursuivi pendant 14 jours.

Le chlorambucil et le cyclophosphamide sont essayés aux doses moyennes respectives de 8 et 10 mg/kg/j. sur 3 et 4 rats.

2.9. ÉTUDE COMPARÉE DES PROPRIÉTÉS ANTI-INFLAMMATOIRES ET DES EFFETS CYTOTOXIQUES DES IMMUNOSUPPRESSEURS

Nous avons étudié trois aspects de la réaction inflammatoire :

- la phase exsudative, par le test de l'œdème à la carragénine,
- la prolifération histiocytaire et fibroblastique par le test du pellet d'ivalon (éponge de polyvinyl),
- la synthèse de mucopolysaccharides et de tissu collagène, par le test de granulome à la carragénine. Les animaux utilisés, sont des rats mâles de la souche WISTAR, pesant 200 ± 20 grammes.

2.9.1 L'ŒDEME A LA CARRAGÉNINE

A — INDUCTION DE L'ŒDEME

Cet œdème est réalisé en injectant dans le coussinet plantaire de la patte arrière droite du rat, 0,05 ml d'un gel aqueux de carragénine à 1 % (viscarine standard-AUBY, Neuilly) préparé extemporanément.

La patte préalablement nettoyée à l'éther, est introduite dans la cuve de plongée d'un pléthysmomètre à mercure (Ugo basile), comportant un pont de Wheatstone.

Les variations de résistance du circuit, converties en volts, sont directement proportionnelles aux variations de volume dans la cuve de plongée, c'est-à-dire, au volume de la patte.

Les mesures sont faites immédiatement après l'injection phlogogène (V. 0 h.) et 3 heures après (V. 3 h.).

Le pourcentage d'augmentation du volume de la patte est calculé d'après la formule :

$$\% \text{ d'augmentation} = \frac{(V. 3 \text{ h.} - V. 0 \text{ h.})}{V. 0 \text{ h.}} \times 100$$

B — MODALITÉS DES TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS.

Le SAL-T

Le SAL-T est administré par voie I.P., à 10 rats, à la dose de 2 ml par animal, 4 heures avant l'injection de carragénine.

L'effet lymphopéniant est contrôlé chez 5 rats sur 10, par une numération différentielle avant l'injection du sérum et 4 heures après.

Les 10 témoins correspondants, reçoivent du sérum physiologique dans les mêmes conditions et cinq d'entre eux, subissent un contrôle hématologique.

Les ANTI-MITOTIQUES

Les cinq anti-mitotiques sont administrés préventivement, pendant les 6 ou 7 jours qui précèdent l'injection phlogogène et parfois 1 heure avant (*).

Les témoins reçoivent l'excipient per os.

Les protocoles d'administration figurent dans le tableau N° 11 ci-après.

TABLEAU N° 11

Modalité d'administration des anti-mitotiques. Test de l'œdème à la carragénine - effet préventif.

Traitements	Nb. de rats	Modalité d'administration		
		Dose en mg/kg Nb. injections		Dose moyenne/J. en mg/kg
AZA ... (per os)	20	Dose 40,0	Inject. 7	40,00
CHLO ... (per os)	20*	2,0	7	2,00
	20*	4,0	7	4,00
	20*	8,0	7	8,00
	10	10,0 5,0	4 2	8,33
C.P.P. (S/C)	10	10,0	7	10,00
MTX (per os)	10*	0,2	7	0,20
5-FU (S/C)	10*	12,5	7	12,50

* Les produits sont administrés une heure avant la carragénine.

2.9.2. Le test du Pellet d'Ivalon

A – RÉALISATION DU TEST

Ce test explorant les phénomènes cellulaires tardifs de la réaction inflammatoire, est réalisé en implantant sous la peau dorsale du rat, deux à quatre pellets d'ivalon de même poids.

Des cylindres découpés dans cette éponge de polyvinyl sont lavés, séchés et coupés en fragments de 20 ± 2 mg. Ces pellets stérilisés dans du sérum physiologique, à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes, sont ensuite séchés à l'étuve. Pour éviter toute surinfection, les implants sont imbibés d'une solution de pénicilline et colimycine.

Au bout de 8 jours d'évolution, les pellets sont excisés stérilement de leur coque conjonctive, séchés à l'étuve puis pesés. Le poids de colonisation cellulaire est obtenu par différence entre le poids final et le poids initial.

B – MODALITÉS DES TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS

Le SAL-T

est administré par voie I.P., à 10 rats, à la dose totale de 6 ml répartis en 1 ml/j., à J-2, J-1, J0, J1, J2 et J4. (J0 étant le jour de l'implantation du pellet). Les témoins reçoivent dans les mêmes conditions du sérum physiologique.

Les ANTI-MITOTIQUES

Les anti-mitotiques sont administrés selon deux protocoles :

- préventivement : c'est-à-dire chaque jour durant les 8 jours qui précèdent l'implantation de l'éponge. Dans ces conditions l'azathioprine, le chlorambucil et le cyclophosphamide sont testés chacun sur des lots de 5 rats,
- curativement : c'est-à-dire quotidiennement à partir du jour de l'implant et pendant toute l'évolution de la réaction inflammatoire. Dans ces conditions, l'azathioprine, le chlorambucil, le cyclophosphamide, le 5-fluoro uracile et le méthotrexate sont testés chacun sur 15 rats.

Dans toutes les expériences, les témoins reçoivent l'excipient per os.

Les protocoles d'administration figurent dans le tableau N° 12

TABLEAU N° 12

*Modalité d'administration des anti-mitotiques. Le test du pellet d'ivalon.
Effets préventif et curatif.*

Traitements	Nb. de rats	Modalité d'administration			
		Dose en mg/kg Nb. injections		Dose moyenne/j. en mg/kg	Voie
AZA ... P C	5	Dose 40,0	Inj. 7	40,0	per os
	15				
CHLO ... P C	5	10,0	7	10,0	per os
	15				
C.P.P. P C	5	12,0	7	12,0	S/C
	15				
5-FU C	10	12,5	7	12,5	S/C
MTX C	20	0,2	7	0,2	per os

P : effet préventif

C : effet curatif

Dans chaque expérience, le nombre des rats «témoins» est identique à celui des traités.

2.9.3. Le test du granulome à la carragénine

A – RÉALISATION DE CE TEST

Ce test qui explore le processus de synthèse de tissu collagène par les fibroblastes, est réalisé par l'injection sous-cutanée dorsale de 0,5 ml d'un gel aqueux de carragénine à 0,5 %, préparé extemporanément.

Au bout de 6 jours d'évolution, le granulome formé est disséqué. Il est ensuite déshydraté et dégraissé dans un mélange à volume égal d'acétone et d'éther de pétrole. Il est séché à l'étuve à 56°C pendant 48 heures. Enfin, le granulome est pesé à l'état sec.

B – MODALITÉS D'ADMINISTRATION DES TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS

L'azathioprine, le méthotrexate, le chlorambucil et le cyclophosphamide sont administrés curativement, à partir du jour de l'injection de la carragénine et durant toute l'évolution de la réaction inflammatoire.

Les témoins reçoivent l'excipient, per os.

Les protocoles d'administration figurent dans le tableau N° 13

TABLEAU N° 13

*Modalité d'administration des anti-mitotiques
Le granulome à la carragénine*

Traitements	Nb. de rats	Modalité d'administration			
		Dose en mg/kg Nb. injections		Dose moyenne/j. en mg/kg	Voie
AZA ...	10	Dose 40,0	Inj. 5	40,0	per os
CHLO...	20	10,0 5,0	3 1	9,0	per os
C.P.P.	20	10,0	5	10,0	S/C
MTX	20	0,2	5	0,2	per os

Dans chaque expérience, le nombre de rats «témoins» est identique à celui des traités.

2.9.4. Étude de la cytotoxicité des anti-mitotiques soumis à ces différents tests anti-inflammatoires.

Cette étude comporte une numération différentielle des leucocytes sanguins au bleu de crésyl à 1 %, une formule leucocytaire et un myélogramme. Les résultats de ces examens obtenus chez des rats WISTAR, normaux, figurent dans les planches hors texte N° III et N° IV.

Ces examens hématologiques sont pratiqués chez les rats soumis aux tests anti-inflammatoires de l'œdème à la carragénine et du test du pellet d'ivalon.

Cette étude se présente sous trois aspects :

A – RECHERCHE DE L'EFFET CYTOTOXIQUE DES MÉDICAMENTS.

Les examens sont réalisés avant et après traitement en dehors de toute réaction inflammatoire.

B – RECHERCHE DES MODIFICATIONS HÉMATOLOGIQUES LIÉES A LA RÉACTION PHLOGOGÈNE, SOUS TRAITEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR

Les examens sont faits à JO (jour de l'implantation du pellet et début du traitement) et J8 (jour de la fin de l'expérience).

C - RECHERCHE DES ALTÉRATIONS HÉMATOLOGIQUES TARDIVES DUES AU TRAITEMENT ADMINISTRÉ AVANT LA RÉACTION PHLOGOGÈNE

Les examens sont réalisés avant le début du traitement (J-8) et 8 jours après la dernière administration (J8), c'est-à-dire le jour de la dissection du pellet.

—

3 - RESULTATS

3 – RÉSULTATS

3.1. ACTIVITÉ «IN VITRO» DES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES

3.1.1. La lymphoagglutination

Les résultats figurent dans le tableau N° 14

TABLEAU N° 14

Pouvoir lymphoagglutinant

Suspension cellulaire de SAL à tester	RATE 20 x 10 ⁶ cellules vivantes	GANGLION 20 x 10 ⁶ cellules vivantes	THYMUS 20 x 10 ⁶ cellules vivantes
SAL-T	1/32 au 1/256	1/64 au 1/256	1/128 au 1/256
SAL-G	1/8 au 1/32	1/64 au 1/128	1/128
SAL-S	1/32 au 1/128	1/128 au 1/256	1/128 au 1/256
SAL-MT	1/32 au 1/256	1/256	1/64 au 1/1024
SAL-NT	1/64	1/64 au 1/128	1/64 au 1/128
SN	1/8 au 1/16	0 au 1/4	0 au 1/4

Nous considérons la lymphoagglutination comme positive à partir de la dilution 1/32 et au dessus. Dans ces conditions, le SN est dénué de propriété lymphoagglutinante. Les divers SAL ont une activité similaire mais l'agglutination vis-à-vis des cellules spléniques est la plus faible.

3.1.2. la lymphostimulation

Les résultats figurent dans le tableau N° 15

TABLEAU N° 15

Pouvoir lymphostimulant

SAL à tester	Nombre de rats	Moyenne du % de transformation	
		En présence de SAL	En présence de PHA
SAL-T	6	6,7	3,7
SAL-G	4	2,9	3,0
SAL-S	4	10,2	10,8
SN	3	0,2	2,5

Les trois SAL testés induisent la transformation lymphoblastique des lymphocytes en culture. Leur pouvoir lymphostimulant est comparable à celui de la PHA. Il est spécifique puisque le sérum normal de lapin ne produit pas de transformation.

La culture de lymphocytes de rat est une technique difficile du fait de la grande mortalité des cellules lymphoïdes et d'une contamination importante par les polynucléaires.

Cette méthode n'est pas quantitative, aussi ne permet-elle pas la comparaison des pouvoirs lymphostimulants des SAL testés.

Quel que soit le stimulus, les taux de transformation obtenus sont faibles et toujours inférieurs à 20 %. Ce qui explique les échecs de la méthode quantitative utilisant l'incorporation de la thymidine ^3H .

3.1.3. L'inhibition de la migration des thymocytes.

Les résultats portent sur l'indice de migration (Im).

$$\text{Im} = \frac{\text{surface moyenne de migration en présence de SAL}}{\text{surface moyenne de migration sans SAL}}$$

Ils figurent dans le tableau N° 16

TABLEAU N° 16

Étude de l'inhibition de la migration des thymocytes.

SAL à tester \ Dilutions	1/10	1/100	1/500	1/1000
SAL-T	0,12	0,15		0,65
SAL-MT	0,15	0,12	0,30	0,82
SAL-NT	0,35	0,38	0,13	0,89

La migration des thymocytes est inhibée jusqu'à une dilution 1/500 du SAL.

En ce qui concerne le mécanisme de cette inhibition, il s'agit probablement d'une agglutination des thymocytes et non d'un effet cytotoxique. En effet, les cellules restent viables (testées par l'exclusion du bleu trypan).

3.2. LA POLYARTHRITE A ADJUVANT

3.2.1. Description de l'arthrite et des lésions viscérales

A – LES LÉSIONS ARTICULAIRES

Les lésions articulaires sont de deux types :

- une lésion inflammatoire précoce au lieu d'injection de l'antigène (la patte postérieure ou la racine de la queue). Cette réaction non spécifique, est vraisemblablement provoquée par l'irritation due à l'adjuvant. L'œdème et la rougeur apparaissent dans les heures qui suivent le stimulus, passent par un maximum vers le 3ème jour, puis régressent pour subir une poussée évolutive au moment de l'apparition de la polyarthrite immunologique ;
- une polyarthrite secondaire qui survient en moyenne entre le 10ème et le 14ème jours après l'injection de l'adjuvant. C'est une arthrite sévère, très inflammatoire qui touche essentiellement les articulations des extrémités en peau glabre. L'atteinte des genoux est relativement fréquente et se rencontre chez les rats les plus fortement atteints. Les lésions de la queue sont constantes chez les animaux ayant reçu l'adjuvant dans la patte.

Cette arthrite s'accompagne de tendinite et de ténosynovite. La réaction inflammatoire évolue d'abord sur un mode aigu et s'accompagne d'une perte de poids de l'animal. Elle atteint son maximum d'intensité entre la troisième et la quatrième semaines après l'injection antigénique,

puis décroît lentement à partir du 30ème jour en laissant des lésions trophiques évolutives :

- hyperostoses visibles sur les radiographies du rachis, du crâne, des os et des articulations des membres ;
- ankylose osseuse et rétraction du tissu conjonctif périarticulaire ;
- déminéralisation des articulations périphériques ;
- parfois, nécrose de la patte injectée et de la queue.

La réaction inflammatoire est très rarement fugace, dans ce cas, elle disparaît sans laisser de séquelle.

Parfois, la polyarthrite est le siège de flambée inflammatoire tardive, pouvant survenir plusieurs mois après l'injection déclenchante.

B – LES LÉSIONS VISCÉRALES

Les lésions viscérales sont pratiquement constantes. Il s'agit :

- de lésions du système lymphatique, non seulement les ganglions satellites des articulations touchées sont tuméfiés, mais encore les ganglions profonds, en particulier les latéro-aortiques et médiastinaux ;
- de lésions cutanées qui sont de deux types : des papules érythémateuses apparaissant vers le 7ème jour au niveau des oreilles et des lésions kératodermiques, de manifestation tardive, s'accompagnant d'une alopecie ;
- de lésions oculaires à type de conjonctivite, de kératite et d'iridocyclite ;
- de lésions génito-urinaires : urétrite et balanophosthite avec parfois écoulement purulent ;
- de lésions du tractus digestif : diarrhée fréquente associée à l'atteinte génitale.

C – COTATION DE L'ARTHRITE

L'intensité de la réaction inflammatoire est cotée au niveau des articulations et groupes articulaires décrits ci-dessous : radiocarpiales, genoux, tibiotarsales, interphalangiennes des quatre doigts des membres antérieurs et des cinq orteils des membres postérieurs, les métacarpo et métatarsophalangiennes ainsi que la queue, sont comptés comme une seule articulation.

Nous cotons séparément les atteintes articulaires primaire et secondaire selon le système décrit dans le tableau n° 17

TABLEAU N° 17

Cotation de l'arthrite

Cote	Lésions des articulations	Lésions de la queue
0	– aspect normal	– aspect normal
1	– érythème	– tuméfaction localisée à la racine ou présence d'un nodule
2	– érythème + gonflement	– raideur et œdème plus étendu avec nodosité sur plusieurs segments
3	– aspect pseudo-phlegmoneux	– tuméfaction globale de toute la queue
4	– nécrose	– nécrose

Les genoux sont cotés de 1 à 3 selon l'intensité du gonflement et de la raideur.

Les calculs statistiques portent sur les moyennes des cotations de 1, 2 ou 3 jours.

3.2.2. Signes biologiques de la polyarthrite à adjuvant

A — RECHERCHE DES ANTICORPS CIRCULANTS «ANTI-MYCOBACTÉRIENS» DANS LA POLYARTHRITE A ADJUVANT

Par la méthode d'OUCHTERLONY, en utilisant comme antigène du mycobactérium tuberculosis séché et tué (H 37 Ra Difco), ou de la tuberculine purifiée de l'Institut Pasteur, il n'a pas été possible de mettre en évidence des anticorps circulants dans le sérum des rats atteints de polyarthrite.

B — LA RÉACTION TUBERCULINIQUE

Quelle que soit la date de sa réalisation, après l'apparition de la polyarthrite immunologique, cette réaction cutanée est et reste positive chez 90 à 100 % des rats, tout au long de l'évolution de la maladie.

C — LES MANIFESTATIONS HÉMATOLOGIQUES

La vitesse de sédimentation (V.S.)

La vitesse de sédimentation globulaire des rats normaux «SPRAGUE DAWLEY» âgés de 9 semaines, est de 1 à 2 mm à la première heure.

Chez les animaux atteints de polyarthrite, en période de pleine évolution, au 21ème jour, la V.S. au bout de la 1ère heure varie de 6 à 8 mm.

L'hémogramme

Les variations sont étudiées 16 et 30 jours après l'injection de l'adjuvant.

Les résultats figurent dans le tableau N° 18

TABLEAU N° 18

*Modifications hématologiques provoquées par la polyarthrite à adjuvant.
Résultats obtenus 16 et 30 jours après l'injection antigénique.*

HÉMOGRAMME	J 16 (8 rats)	J 30 (24 rats)
Micro-hématocrite	0	—
Nb. des leucocytes totaux	+ +	+
Nb. des cellules mononucléées	0	±
Nb. des polynucléaires	+ +	+
% polynucléaires neutrophiles	+ +	+ +
% petits lymphocytes	—	— —
% grands lymphocytes	—	0
% monocytes	0	+

+ : augmentation

0 : pas de modification

— : diminution

- AU 16ème JOUR, la polyarthrite s'accompagne d'une hyperleucocytose globale avec polynucléose neutrophile importante et une lymphopénie relative. Le taux des monocytes n'est pas modifié. A cette date, une anémie ne peut être mise en évidence.
- AU 30ème JOUR, la polyarthrite s'accompagne d'une anémie. L'hyperleucocytose et la polynucléose neutrophile sont moins intenses qu'au 16ème jour. Aussi, la lymphopénie est-elle moins importante. Par contre, le taux des monocytes est augmenté.

Poliarthrite à Adjuvant

1^{er} "Set"

Sérums Anti-Lymphocytaires -(SAL)

par voie	I.P.
—	Témoin
—	SAL-G
—	SAL-S
—	SAL-T
—	SN

Indice d'arthrite

J₀ J₅ J₉ J₁₂

ml de sérum / rat

1,0
0,5
0,01

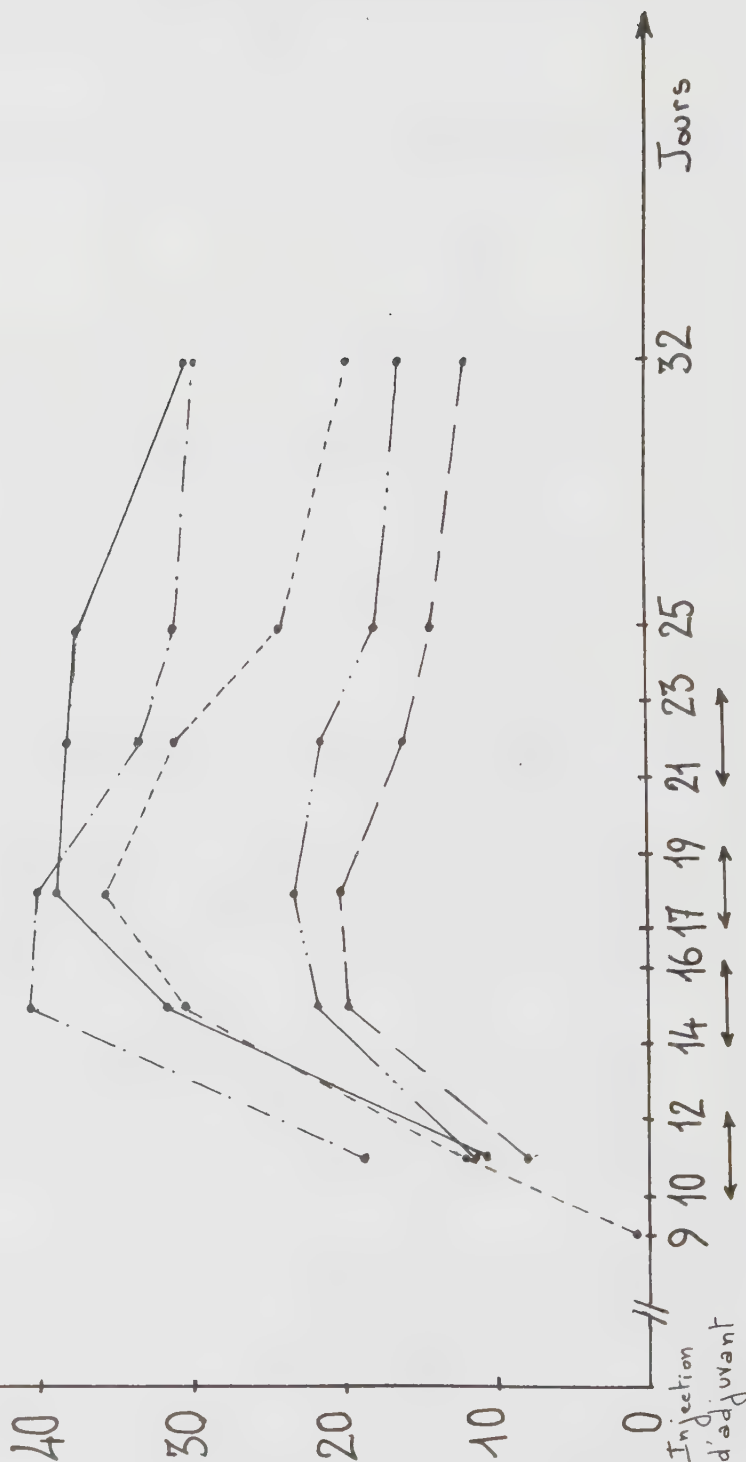


TABLEAU N° 20

Indice moyen d'arthrite au cours de l'évolution.
Nombre de rats sans arthrite.

TRAITEMENTS \ JOURS		J10, 11, 12	J17, 18, 19	J 25	J 32
T	m ± s	10,5 ± 4,4	38,9 ± 12,3	37,2 ± 13,4	30,1 ± 11,3
	Nb. rats s. arth.	0/10	0/10	0/10	0/10
SAL-T	m ± s	7,8 ± 6,3 N.S.	20,0 ± 14,0 p < 0,01	14,1 ± 15,8 p < 0,01	11,8 ± 14,9 p < 0,01
	Nb. rats s. arth.	1/10	0/10	1/10	2/10
SAL-G	m ± s	11,3 ± 11,6 N.S.	23,1 ± 18,8 p = 0,05	17,8 ± 14,9 p < 0,01	16,0 ± 13,0 p = 0,05
	Nb. rats s. arth.	1/10	0/9	0/9	0/9
SAL-S	m ± s	11,9 ± 12,2 N.S.	35,5 ± 8,7 N.S.	24,1 ± 14,0 p = 0,05	19,4 ± 11,2 p = 0,05
	Nb. rats s. arth.	0/10	0/10	0/10	0/9
SN	m ± s	18,6 ± 12,6 N.S.	40,0 ± 15,8 N.S.	31,1 ± 20,2 N.S.	29,7 ± 18,9 N.S.
	Nb. rats s. arth.	2/9	1/9	0/9	0/9

Les comparaisons avec les témoins sont faites à l'aide des tests F ou W.

N.S. = non significatif.

2ème expérience : Polyarthrite après une stimulation antigénique.
Les résultats figurent dans le tableau N° 21 et la courbe n° 2.

COURBE N° 2

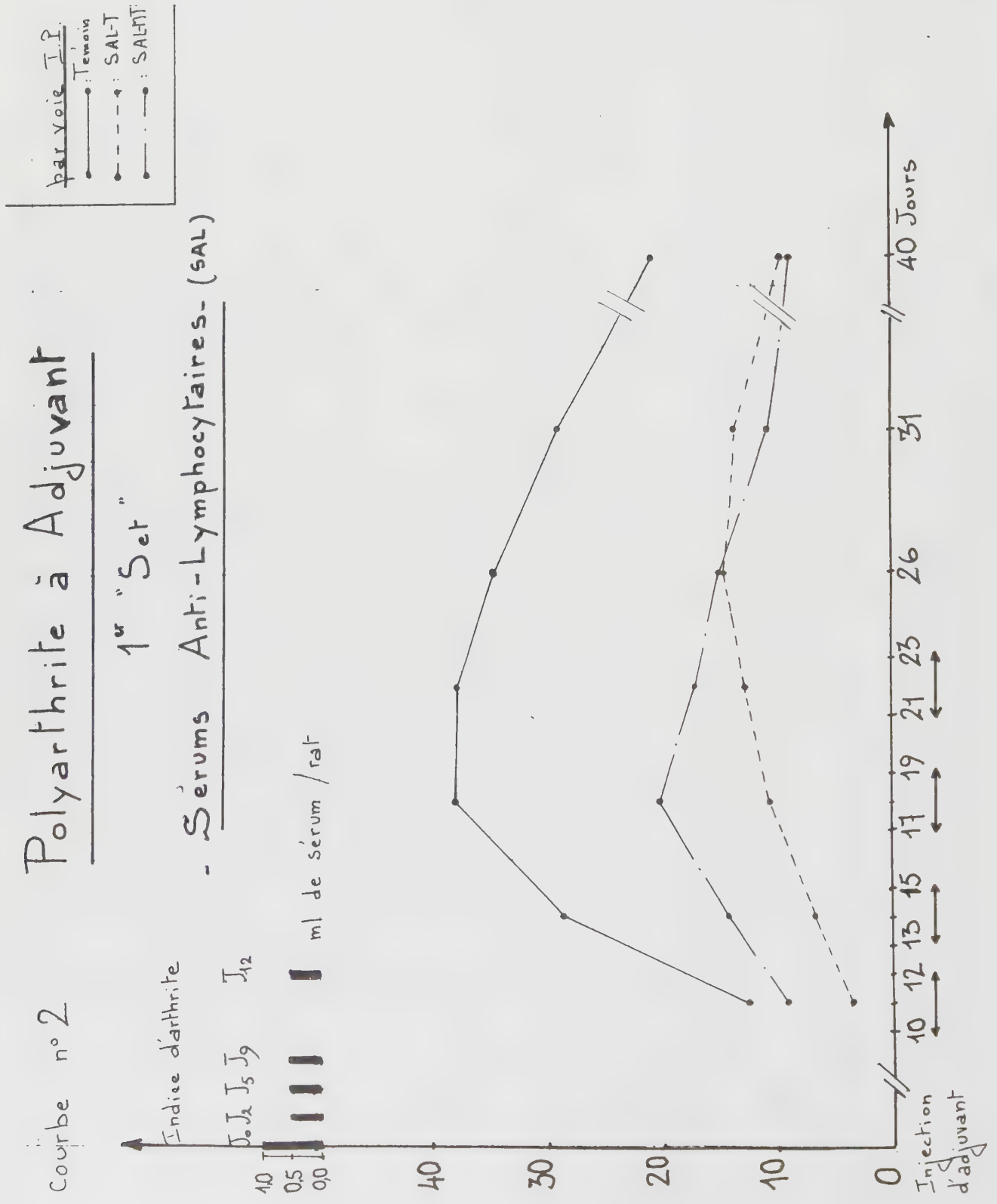


TABLEAU N° 21
Indice moyen d'arthrite au cours de l'évolution
Nombre de rats sans arthrite

TRAITEMENTS \ JOURS		J10, 11, 12	J17, 19	J26	J31
T	m ± s	12,5 ± 9,4	38,0 ± 16,5	34,7 ± 13,5	28,9 ± 10,4
	Nb. rats s. arth.	1/10	1/10	0/10	0/10
SAL-T	m ± s	3,5 ± 4,7 p = 0,05	10,7 ± 11,8 p < 0,01	14,7 ± 10,9 p < 0,01	13,8 ± 9,6 p < 0,01
	Nb. rats s. arth.	5/10	2/9	1/9	1/9
SAL-MT	m ± s	9,2 ± 11,6 N.S.	20,2 ± 9,9 p = 0,05	15,0 ± 4,5 p < 0,01	10,8 ± 6,4 p < 0,01
	Nb. rats s. arth.	2/9	0/8	0/7	1/6

N.S. = non significatif.

Les comparaisons avec les témoins sont faites à l'aide des tests F ou W.

Les résultats obtenus à partir de ces deux expériences montrent qu'aucun SAL n'est capable de prévenir l'apparition de la maladie articulaire, mais, ils possèdent tous une action atténuante. Si l'on considère le pourcentage de diminution de l'indice d'arthrite des animaux traités par rapport à celui des témoins au cours de la troisième semaine d'évolution, l'activité anti-arthritique des sérums se classe ainsi :

- le SAL-T (58 % à 66 %)
- le SAL-MT (55 %)
- le SAL-G (45 %)
- le SAL-S (18 %)
- le SN (13 %)

L'analyse statistique montre que le sérum normal de lapin est inactif et que l'efficacité du SAL-S est très faible et transitoire.

Sur la polyarthrite obtenue après deux stimulations antigéniques à J0 et J30.

Les résultats figurent dans le tableau N° 22 et la courbe N° 3 ci-après.

TABLEAU N° 22
Polyarthrite après deux stimulations antigéniques – Indice moyen d'arthrite au cours de l'évolution.

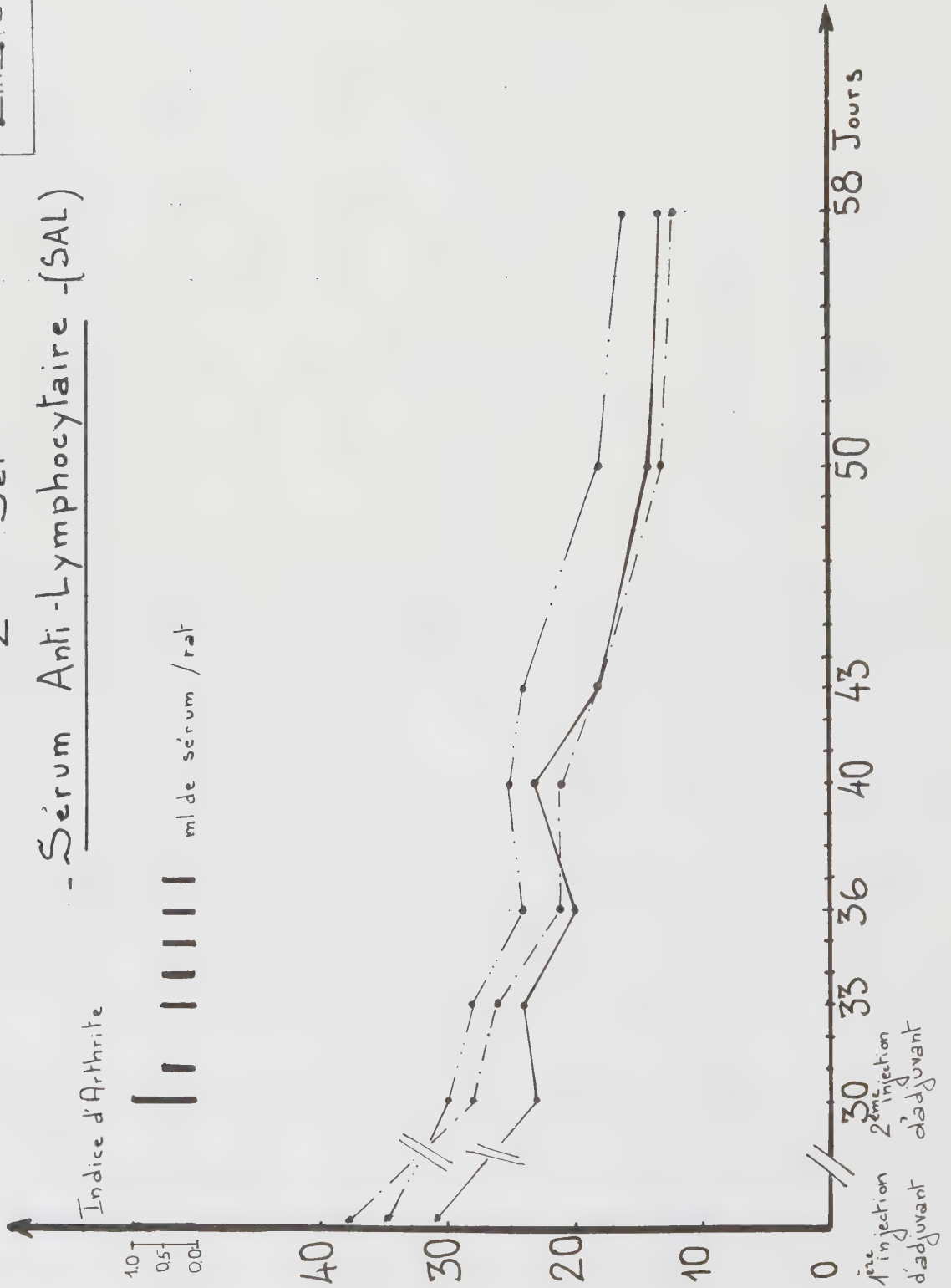
TRAITEMENTS \ JOURS		J30	J33	J40	J58
T	Nb. de rats	14	14	14	14
	m ± s	23,0 ± 10,5	24,0 ± 7,4	23,0 ± 12,1	13,4 ± 8,8
SAL-T	Nb. de rats	15	15	15	15
	m ± s	28,0 ± 15,3	26,0 ± 10,6 N.S.	21,0 ± 9,5 N.S.	12,4 ± 7,9 N.S.
SN	Nb. de rats	15	15	15	15
	m ± s	30,0 ± 17,6	28,0 ± 12,3 N.S.	25,0 ± 10,8 N.S.	16,1 ± 11,0 N.S.

Polyarthrite à Adjuvant

2^{ème} "Set"

- Sérum Anti-Lymphocytaire -(SAL)

par voie IP
• Témoin
• SAL-T
• SN



Le traitement est commencé à J30, jour de la deuxième stimulation antigénique. La dernière injection a lieu à J37. Dans ces conditions, le SAL-T comme le SN, sont incapables de modifier les manifestations articulaires de la polyarthrite à adjuvant. Il est probable que la deuxième injection d'adjuvant, n'a pas induit de réaction immunologique. En effet, l'analyse statistique montre qu'il n'y a pas eu d'augmentation de l'intensité de la polyarthrite.

B – EFFETS GÉNÉRAUX DES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES

Sur la polyarthrite après une stimulation antigénique :

Tous les SAL sont toxiques pour le rat. Ils ont provoqué les taux de mortalité suivants :

- le SAL-T : 1 rat sur 20 (5 %)
- le SAL-G : 1 rat sur 10 (10 %)
- le SAL-S : 1 rat sur 10 (10 %)
- le SAL-MT : 4 rats sur 10 (40 %)
- le SN : 1 rat sur 10 (10 %)

Chez les rats atteints de polyarthrite, après deux stimulations antigéniques :

Les sérums utilisés n'ont pas provoqué de mortalité. Cette absence de toxicité est probablement liée à la meilleure qualité de leur préparation et en particulier, à l'élimination plus complète des hémagglutinines.

Les variations de poids corporel à J24, par rapport à celui de J0, montrent que les animaux qui ont le moins maigri sont ceux qui ont été traités par les SAL les plus actifs.

Les résultats figurent dans le tableau N° 23.

TABLEAU N° 23

Variation du poids corporel ($m \pm s$)

Traitements	Une stimulation antigénique Variation J0 - J24	Deux stimulations antigéniques Variation J0 - J30
T	– 12 % $\pm$ 4 %	+ 15 % $\pm$ 15 %
SN	– 6 % $\pm$ 13 % N.S.	+ 11 % $\pm$ 13 % N.S.
SAL-T	+ 1 % $\pm$ 7 % $p = 0,01$	+ 17 % $\pm$ 14 % N.S.
SAL-G	– 2 % $\pm$ 8 % $p = 0,01$	
SAL-S	– 8 % $\pm$ 5 % N.S.	
SAL-MT	– 3 % $\pm$ 10 % N.S.	

Les comparaisons avec les témoins, sont faites à l'aide du test W.

C – EFFETS DES SAL SUR LA RÉACTION TUBERCULINIQUE

Sur la polyarthrite après une stimulation antigénique :

– TEST A LA TUBERCULINE FAIT SOUS TRAITEMENT 12 JOURS APRES L'INJECTION DE L'ADJUVANT

Les résultats figurent dans le tableau n° 24

TABLEAU N° 24

Lecture de la réaction 24 heures après l'injection I.D.

Diamètre de l'induration \ Traitements	T (10 rats)	SAL-T (9 rats)	SAL-MT (8 rats)
$m \pm s$ (en mm) Comparaison avec les témoins	10,0 $\pm$ 4,6	4,2 $\pm$ 5,0 $p = 0,05$	10,2 $\pm$ 2,4 N.S.

– TEST A LA TUBERCULINE FAIT 12 JOURS APRES L'ARRET DU TRAITEMENT

Les résultats figurent dans le tableau n° 25

TABLEAU N° 25

Lecture de la réaction 24 heures après l'injection I.D.

Traitements Diamètre de l'induration	T (10 rats)	SAL-T (10 rats)	SAL-G (9 rats)	SAL-S (9 rats)	SN (8 rats)
m ± s (en mm)	9,7 ± 4,6	12,2 ± 4,3	12,2 ± 2,9	15,2 ± 3,6	9,4 ± 5,6
Comparaison avec les témoins		N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Sur la polyarthrite, après deux stimulations antigéniques :

Le test est réalisé sous traitement à J 35.

Les résultats figurent dans le tableau n° 26

TABLEAU N° 26

Lecture de la réaction 24 heures après l'injection I.D.

Traitements Diamètre de l'induration	T (14 rats)	SAL-T (15 rats)	SN (15 rats)
m ± s (en mm)	8,1 ± 4,5	8,4 ± 4,0	8,4 ± 4,5
Comparaison avec les témoins		N.S.	N.S.

Ces résultats sur la réaction tuberculinique mettent en évidence les faits suivants :

- lorsque le test cutané est réalisé 12 jours après l'arrêt du traitement, aucun SAL ne déprime la réaction,
- lorsque le test à la tuberculine est réalisé sous traitement :
 - sur la polyarthrite après une stimulation antigénique :
 - le SAL-T, doué de la plus forte activité anti-arthritique, déprime la réaction cutanée,
 - le SAL-MT, moins actif sur la polyarthrite, ne modifie pas l'intensité de la réaction tuberculine.
 - sur la polyarthrite après deux stimulations antigéniques :
 - le SAL-T est inactif à la fois sur les manifestations articulaires et sur la réaction d'hypersensibilité à la tuberculine.

Ces résultats ont l'intérêt de montrer la corrélation entre les deux réactions d'immunité cellulaire, chez le même animal : la polyarthrite à adjuvant et la réaction tuberculinique.

D – EFFETS DES SAL SUR LES MANIFESTATIONS HÉMATOLOGIQUES DES RATS ATTEINTS DE POLYARTHRITE A ADJUVANT

Sur l'HEMOGRAMME étudié 30 jours après l'injection de l'adjuvant, soit 18 jours après la dernière administration des SAL.

Les résultats figurent dans le tableau n° 27.

TABLEAU N° 27

Variation de l'hémogramme des rats arthritiques traités par le sérum anti-lymphocytaire.

Variation J0 - J30	T et SN	SAL		
		SAL-T	SAL-G	SAL-S
Nombre de rats	24	3	3	3
Micro-hématocrite	—	0	—	—
Nb. des leucocytes totaux	+	0	0	++
Nb. des cellules mononucléées	±	0	0	0
Nb. des polynucléaires	+	±	+	++
% polynucléaires neutrophiles	++	++	++	++
% petits lymphocytes	---	—	---	---
% grands lymphocytes	0	0	0	0
% Monocytes	0	0	0	0

+: augmentation

0 : pas de modification

— : diminution

D'une façon générale, les SAL les plus actifs sur la polyarthrite, apportent la meilleure correction aux désordres hématologiques induits pas la maladie. Ainsi, le SAL-T est le seul à corriger l'anémie. Les SAL-T et SAL-G corrigent l'hyperleucocytose globale et l'augmentation du taux des cellules mononucléées. Par contre, seul le SAL-T diminue la polynucléose.

Sur le **MYELOGRAMME** étudié 30 jours après l'injection de l'adjuvant, soit 18 jours après la dernière administration des SAL.

Les résultats figurent dans le tableau n° 28

TABLEAU N° 28

Variation du myélogramme des rats arthritiques traités par le sérum anti-lymphocytaire.

Variation J0 - J30	Témoins et SN	SAL (SAL-T, SAL-G, SAL-S)
Nombre de rats	6	9
Cellularité	++	++
Cellules souches monocytoïdes	+	+
Cellules réticulaires	0	0
Myéloblastes	0	0
Promyélocytes	0	0
Myélocytes métamyélocytes	+	0
Polynucléaires	+	+
Lymphocytes	—	—
Monocytes	0	0
Erythroblastes	0	0

+: augmentation

0 : pas de modification

— : diminution

Aucun des sérums anti-lymphocytaires ne corrige totalement les modifications induites par la polyarthrite. On note tout au plus une normalisation du taux des myélocytes et métamyélocytes.

3.2.4. La polyarthrite traitée par les anti-mitotiques

A - EFFETS DES ANTI-MITOTIQUES SUR LES MANIFESTATIONS ARTICULAIRES

Sur la polyarthrite obtenue après une première stimulation antigénique

1ère expérience : les résultats figurent dans le tableau n° 29 ci-après et la courbe n° 4

COURBE N° 4

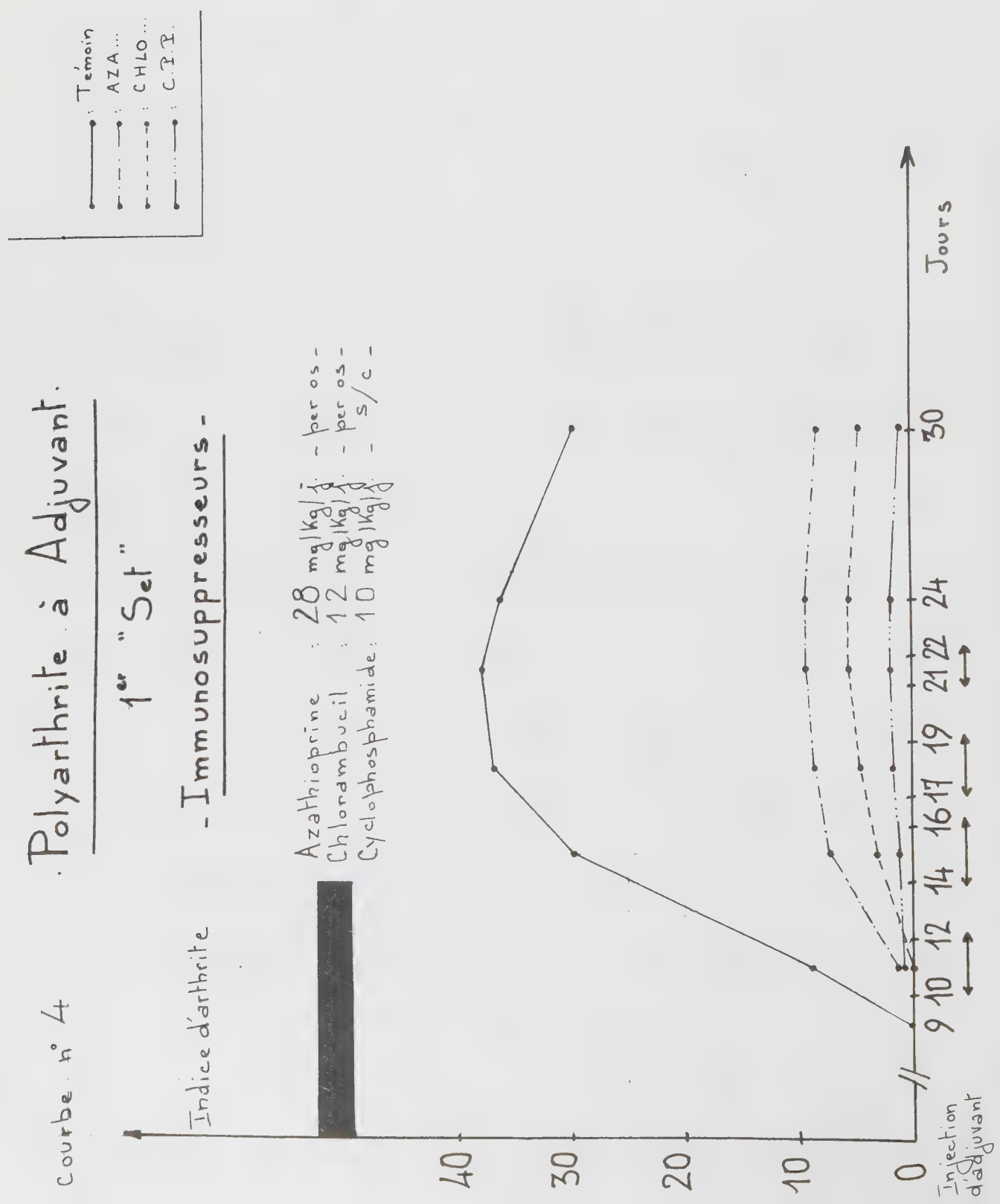


TABLEAU N° 29
Indice moyen d'arthrite au cours de l'évolution.
Nombre de rats sans arthrite.

TRAITEMENTS \ JOURS		J10, 11, 12	J17, 18, 19	J24	J30
T	m ± s	8,8 ± 8,7	36,9 ± 14,8	36,3 ± 11,8	29,7 ± 10,3
	Nb. de rats s. arth.	3/15	0/15	0/15	0/15
AZA . . . 28 mg/kg/j.	m ± s	1,3 ± 2,2 p < 0,01	8,5 ± 12,8 p < 0,01	9,2 ± 13,8 p < 0,01	8,2 ± 13,8 p < 0,01
	Nb. de rats s. arth.	8/12	4/12	4/12	5/12
CHLO. . . 12 mg/kg/j.	m ± s	0,0 ± 0,0 p < 0,01	4,6 ± 6,6 p < 0,01	5,4 ± 8,2 p < 0,01	4,5 ± 6,6 p < 0,01
	Nb. de rats s. arth.	11/11	7/11	6/11	4/11
C.P.P. 10 mg/kg .	m ± s	0,9 ± 1,4 p < 0,01	1,7 ± 4,6 p < 0,01	1,9 ± 3,0 p < 0,01	1,0 ± 2,0 p < 0,01
	Nb. de rats s. arth.	8/15	8/15	7/15	11/15

2ème expérience : les résultats figurent dans le tableau n° 30 et la courbe n° 5 ci-après.

TABLEAU N° 30
Indice moyen d'arthrite au cours de l'évolution
Nombre de rats sans arthrite.

TRAITEMENTS \ JOURS		J10, 11, 12	J17, 18, 19	J24, 25	J30
T	m ± s	1,3 ± 3,0	26,1 ± 13,4	27,5 ± 16,1	24,6 ± 15,3
	Nb. de rats s. arth.	10/15	0/15	0/15	0/15
MTX 0,1 mg/kg/j.	m ± s	0,6 ± 1,4 N.S.	0,6 ± 1,4 p < 0,01	3,1 ± 6,2 p < 0,01	4,3 ± 7,5 p < 0,01
	Nb. de rats s. arth.	10/15	11/15	5/15	4/15
5-FU 12,5 mg/kg/j.	m ± s	0,2 ± 0,4 N.S.	1,5 ± 3,8 p < 0,01	6,0 ± 9,8 p < 0,01	7,3 ± 11,1 p < 0,01
	Nb. de rats s. arth.	12/15	7/15	6/15	5/15

Les résultats obtenus à partir de ces deux expériences, montrent que les cinq anti-mitotiques ont tous une action atténuante sur la polyarthrite induite après une seule injection d'adjuvant. Cependant, aucun de ces anti-mitotiques n'est capable, aux doses utilisées, d'empêcher l'apparition de la maladie.

Si l'on considère la pourcentage de l'indice d'arthrite des rats traités par rapport à celui des témoins, l'activité anti-arthritique à la troisième semaine d'évolution peut se classer ainsi :

- le cyclophosphamide (95 %)

— le chlorambucil (85 %)

— l'azathioprine (72 %)
- le méthotrexate (88 %)

— le 5-fluoro uracile (78 %)

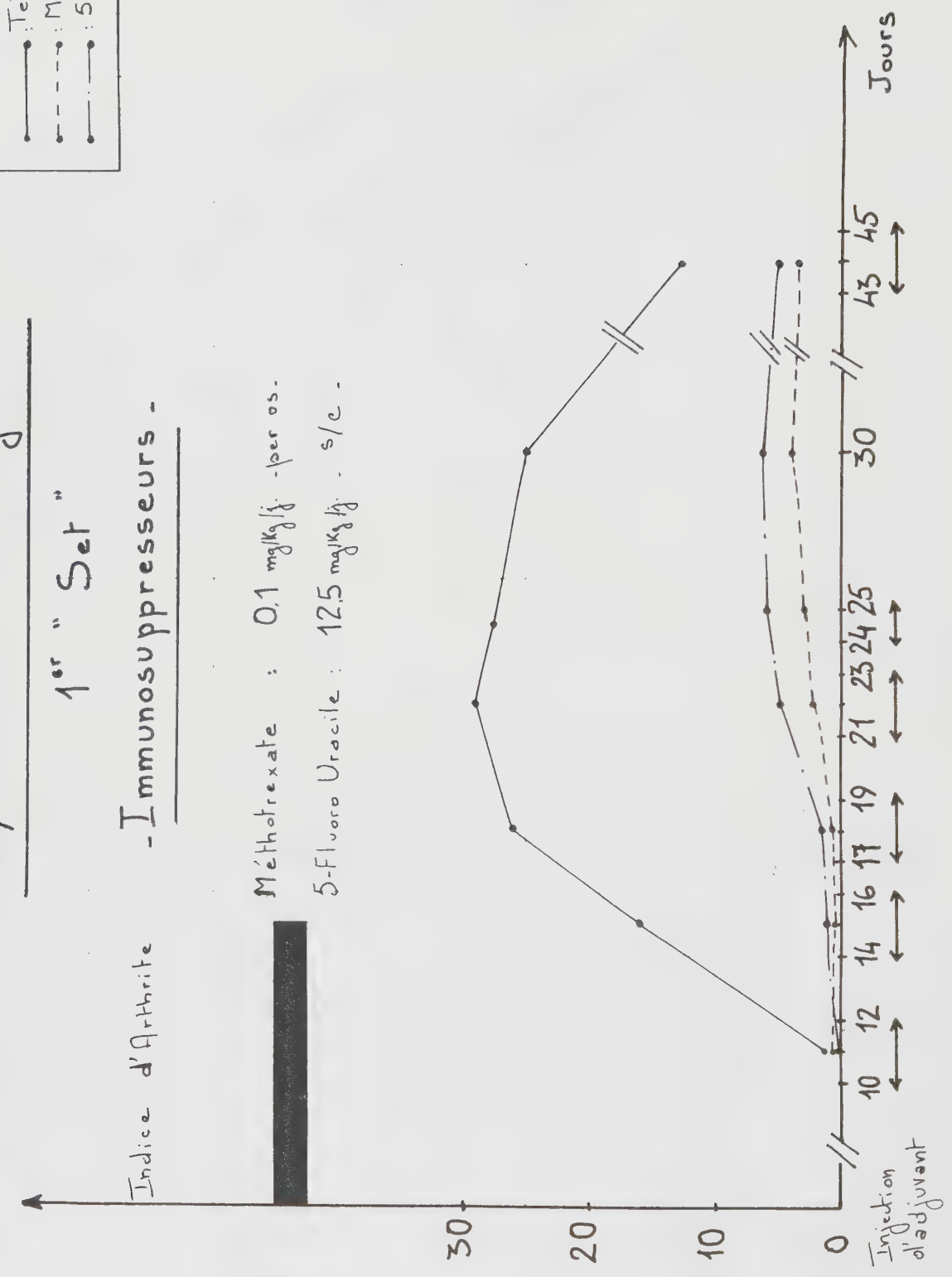
Polyarthrite à Adjuvant

1^{er} " Set "

- Immunosuppresseurs -

Méthotrexate : 0,1 mg/kg j. - per os -
5-Fluoro Uracile : 12,5 mg/kg j. - s/c -

courbe n°5



—•— Témoin
- - - MTX
... 5-FU

Sur la polyarthrite obtenue après une deuxième stimulation antigénique à J31

Les résultats figurent dans le tableau n° 31 et la courbe n° 6 ci-après.

TABLEAU N° 31

Indice moyen d'arthrite au cours de l'évolution.
Le traitement anti-mitotique, commencé à J31, est arrêté à J47.

TRAITEMENTS \ JOURS		J31	J34, 35, 36	J48	J55	J62
T	Nb. de rats	15	15	15	15	15
	m ± s	39,8 ± 12,9	29,6 ± 16,1	34,1 ± 21,0	31,8 ± 19,6	26,4 ± 18,6
	Comparaison avec J31		26 % N.S.	14 % N.S.	20 % N.S.	34 % N.S.
CHLO. . . 6,8 mg/kg/j.	Nb. de rats	15	13	12	11	10
	m ± s	45,1 ± 15,6	34,4 ± 16,1	27,3 ± 17,7	25,0 ± 16,1	20,2 ± 17,3
	Comparaison avec J31		24 % p < 0,01	39 % p = 0,05	44 % p < 0,01	55 % p < 0,01
C.P.P. 10 mg/kg/j	Nb. de rats	15	15	14	10	6
	m ± s	30,5 ± 10,9	20,3 ± 8,0	14,3 ± 7,5	11,8 ± 7,9	9,3 ± 8,9
	Comparaison avec J 31		33 % p < 0,01	53 % p < 0,01	61 % p < 0,01	69 % p < 0,01

Les comparaisons des indices d'arthrite aux différentes dates sont faites par rapport à l'indice côté à J31.

Ces résultats montrent que :

- chez les témoins, l'intensité de la polyarthrite reste en plateau durant un mois environ, puis décroît ;
- chez les rats traités par le chlorambucil et le cyclophosmhamide, l'intensité des manifestations articulaires diminue significativement dès le 4ème jour après le début du traitement.

L'effet atténuant des anti-mitotiques persiste tout au long de l'expérience. Cependant, l'efficacité du chlorambucil est inférieure à celle du cyclophosphamide.

La deuxième stimulation antigénique 31 jours après la première, ne provoque pas de rebond de la polyarthrite et il est probable qu'elle n'induit pas une nouvelle réaction immune. L'action anti-arthritique des deux alkylants n'est donc pas due à un effet immunodépresseur mais à une activité anti-phlogistique.

Polyarthrite à Adjuvant

2ème "Set"

- Immunosuppresseurs -

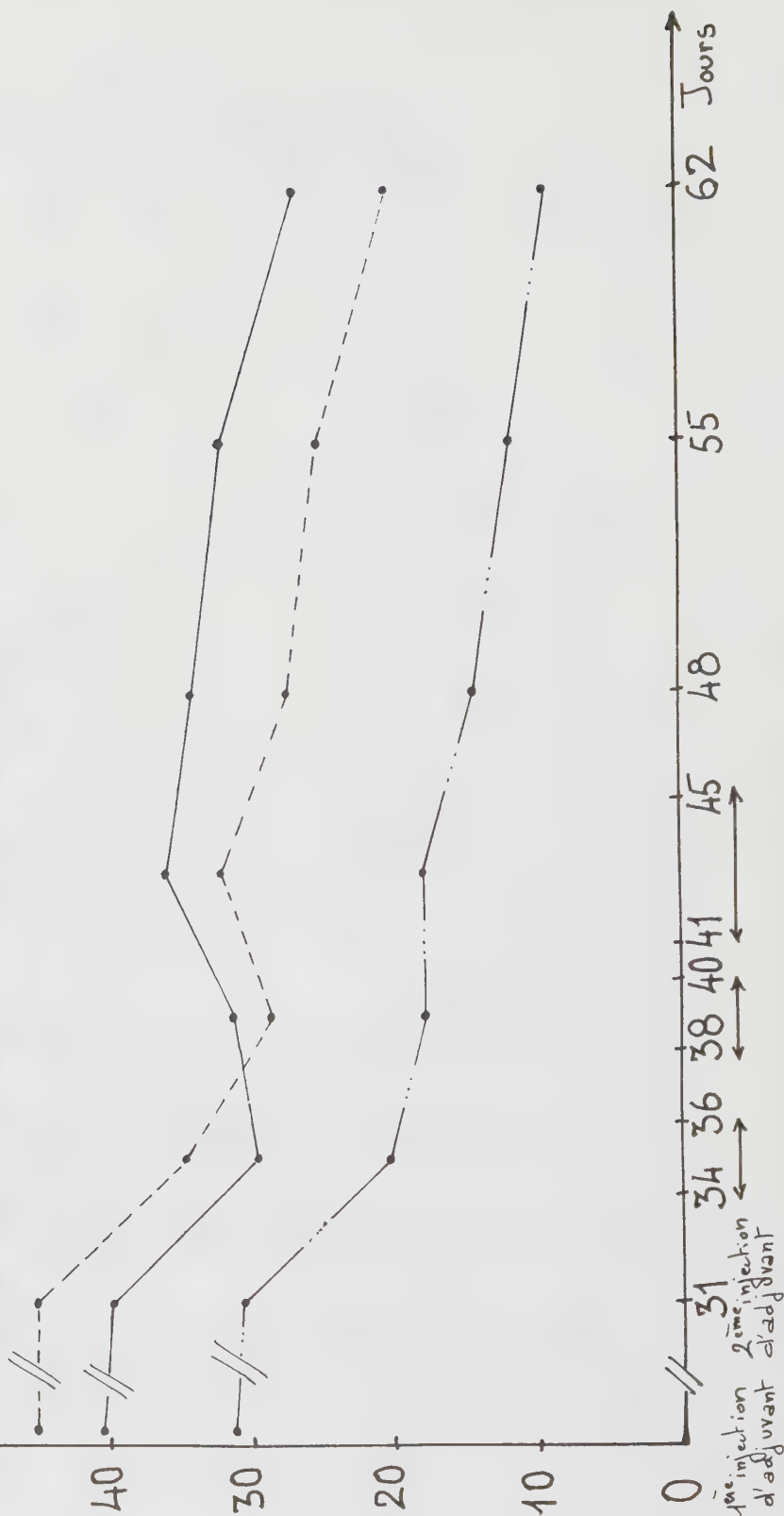
Témoin
CHLO...
c.P.P.

Chlorambucil : 6.8 mg/Kg/j - per os -
Cyclophosphamide : 10.0 mg/Kg/j - s/c -

courbe n° 6

Indice d'arthrite

15
10
5
0



B — EFFETS GÉNÉRAUX DES ANTI-MITOTIQUES

Sur la polyarthrite après une stimulation antigénique :

Seuls, l'azathioprine et le chlorambucil sont toxiques aux doses utilisées. Ils ont provoqué respectivement la mort de 3 rats sur 15 (20 %) et 4 rats sur 15 (27 %).

Les variations du poids corporel à J16 et à J30 par rapport au poids initial (J0), figurent dans le tableau n° 32.

TABLEAU N° 32

Variation du poids corporel ($m \pm s$)

TRAITEMENTS	J16	J30
T (30 rats)	+ 3 $\pm$ 8 %	+ 2 $\pm$ 10 %
AZA ... (12 rats)	- 4 $\pm$ 6 % $p = 0,05$	- 2 $\pm$ 13 % N.S.
CHLO ... (11 rats)	- 16 $\pm$ 5 % $p < 0,01$	+ 1 $\pm$ 11 % N.S.
C.P.P. (15 rats)	- 1 $\pm$ 5 % N.S.	+ 7 $\pm$ 10 % N.S.
MTX (15 rats)	+ 11 $\pm$ 5 % $p = 0,05$	+ 8 $\pm$ 8 % N.S.
5-FU (15 rats)	+ 2 $\pm$ 4 % N.S.	+ 4 $\pm$ 11 % N.S.

Ce tableau révèle que les rats, traités par les anti-mitotiques les moins toxiques et les plus efficaces sur la polyarthrite, présentent à l'arrêt du traitement un poids corporel similaire à celui des témoins. Par contre, les anti-mitotiques les plus toxiques entraînent un amaigrissement.

Quel que soit le traitement, 15 jours après son arrêt, la croissance pondérale des rats est similaire.

Sur la polyarthrite après deux stimulations antigéniques

Le chlorambucil et le cyclophosphamide sont toxiques, ils provoquent respectivement la mort de 5 rats sur 15 (33 %) et 9 rats sur 15 (60 %).

C — EFFETS DES ANTI-MITOTIQUES SUR LA RÉACTION TUBERCULINIQUE CHEZ LES RATS ATTEINTS DE POLYARTHRITE A ADJUVANT

LE TEST TUBERCULINIQUE est réalisé sous traitement ou deux jours après son arrêt.

Les résultats figurent dans les tableaux n° 33 et n° 34. La lecture de la réaction a lieu 24 heures après l'injection intra-dermique.

TABLEAU N° 33 — Lecture de la réaction tuberculinique (24 h) 2 jours après l'arrêt du traitement

POLYARTHRITE APRES UNE STIMULATION ANTIGÉNIQUE			
TRAITEMENTS	TÉMOINS	5-FU (12,5 mg/kg/j.)	MTX (0,1 mg/kg/j.)
Nb. de rats	15	15	15
$m \pm s$ (en mm)	9,0 $\pm$ 3,0	5,0 $\pm$ 5,0	5,0 $\pm$ 4,9
Comparaison avec les témoins		$p < 0,01$	$p < 0,01$

m = moyenne en mm des diamètres maximum et minimum de l'induration

TABLEAU N° 34
Lecture de la réaction tuberculinique 24 h. après l'injection I.D.
Sous traitement immunosuppresseur

POLYARTHRITE APRES UNE STIMULATION ANTIGÉNIQUE				
TRAITEMENTS	TÉMOINS	AZA (28 mg/kg/j.)	CHLO (12 mg/kg/j.)	C.P.P (10 mg/kg/j.)
Nb. de rats	15	15	15	15
m ± s (en mm)	12,9 ± 1,9	1,7 ± 3,7	2,1 ± 3,5	1,1 ± 2,3
Comparaison avec les témoins		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01

POLYARTHRITE APRES DEUX STIMULATIONS ANTIGÉNIQUES			
TRAITEMENTS	TÉMOINS	CHLO (6,8 mg/kg/j.)	C.P.P. (10 mg/kg/j.)
Nb. de rats	15	12	15
m ± s (en mm)	10,1 ± 4,5	8,1 ± 5,4	0,5 ± 0,5
Comparaison avec les témoins		N.S.	p < 0,01

m = moyenne en mm des diamètres maximum et minimum de la papule cutanée (induration)

LE TEST TUBERCULINIQUE est réalisé après l'arrêt du traitement immunosuppresseur. Les résultats figurent dans le tableau n° 35. La lecture de la réaction est faite 24 heures après l'injection I.D.

TABLEAU N° 35
Lecture de la réaction tuberculinique (24 h) 7 jours après l'arrêt du traitement

POLYARTHRITE APRES UNE STIMULATION ANTIGÉNIQUE				
TRAITEMENTS	TÉMOINS	AZA... (28 mg/kg/j.)	CHLO... (12 mg/kg/j.)	C.P.P. (10 mg/kg/j.)
Nb. de rats	15	12	11	15
m ± s (en mm)	7,1 ± 5,5	5,5 ± 4,2	6,4 ± 4,3	11,0 ± 2,0
Comparaison avec les témoins		N.S.	N.S.	N.S.

m = moyenne en mm des diamètres maximum et minimum de l'induration.

Les cinq anti-mitotiques diminuent l'intensité de la réaction tuberculinique mais leur effet immunosuppresseur se manifeste uniquement pendant la durée de leur administration ou très peu de temps après leur arrêt.

L'inefficacité du chlorambucil sur la réaction tuberculinique réalisée après une deuxième stimulation antigénique est probablement liée à l'insuffisance de la dose (6,8 mg/kg/j. au lieu de 8 mg/kg/j. dans le cas de la réponse primaire).

SUR LE MYELOGRAMME étudié 16 jours après la 1ère injection d'adjuvant, c'est-à-dire à l'arrêt du traitement.

Les résultats figurent dans le tableau n° 37

TABLEAU N° 37

Variation du myélogramme des rats arthritiques, traités par les immunosuppresseurs chimiques.

VARIATION J0 - J16	T	AZA	CHLO	C.P.P.	5-FU	MTX
Nb. de rats	8	3	3	3	5	5
Cellularité	+++	++	+	++	++	+
Cellules souches monocytoïdes	+	+	0	+	+	0
Cellules réticulaires	+	0	0	0	+	+
Myéloblastes	+	0	+	—	0	0
Promyélocytes	+	0	0	—	0	0
Myélocytes métamyélocytes	0	0	+	0	0	—
Polynucléaires	+	0	0	+	0	0
Lymphocytes	—	—	—	—	—	+
Monocytes	+	+	0	+	0	0
Érythroblastes	0	0	0	—	0	—

+ : augmentation

0 : pas de modification

— : diminution

Ces résultats mettent en évidence les faits suivants :

- Tous les anti-mitotiques diminuent l'hypercellularité provoquée par la polyarthrite. Cet effet est particulièrement net pour le méthotrexate et le chlorambucil.
- Le chlorambucil et le méthotrexate sont les seules substances à abaisser le taux des cellules souches par rapport à celui des témoins.
- D'une façon générale, les anti-mitotiques corrigent l'augmentation globale des éléments myélocytaires et polynucléaires, induite par la maladie. Les diverses étapes de la maturation des granulocytes sont touchées différemment selon l'agent utilisé.
- Le cyclophosphamide diminue le taux des myéloblastes et des promyélocytes.
- Le méthotrexate, celui de la série myélocyte-métamyélocyte.
- Par contre, le chlorambucil augmente le taux des myéloblastes et de la série myélocyte-métamyélocyte.
- Les autres anti-mitotiques corrigent les modifications des séries granulocytaire et myélocytaire induites par la polyarthrite.
- Seul, le méthotrexate corrige la lymphopénie relative.
- Seuls, le cyclophosphamide et le méthotrexate ont un effet cytotoxique sur la série érythroblastique.

3.3. LA POLYARTHRITE A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS

3.3.1. Description et cotation de l'arthrite

A — DESCRIPTION CLINIQUE

Les premiers signes de la polyarthrite apparaissent 3 jours après l'injection de l'exsudat. Cette maladie touche principalement les articulations distales de l'animal : chevilles, poignets, tarses, carpes, inter-phalangiennes, et les genoux. Il n'y a pas d'atteinte de la queue.

Cette arthrite très inflammatoire, atteint son maximum vers le 9ème jour puis régresse en laissant des séquelles : gonflement périarticulaire et ankylose.

B — DESCRIPTION HISTOLOGIQUE (23)

AU 4ème et 5ème JOURS le tissu périarticulaire et la synoviale sont pénétrés par un infiltrat inflammatoire très développé. Cet infiltrat est très polymorphe, riche en polynucléaires, en fibroblastes. La néovascularisation est importante.

AU 12ème JOUR, l'infiltrat réalise un véritable pannus qui détruit le cartilage articulaire. Cet infiltrat est composé essentiellement de cellules mononucléées. Il est plus riche en fibres collagènes mais moins cellulaire et moins vasculaire qu'au 4ème jour. On note en outre dans la synoviale, quelques nodules histioleucocytaires dont les histiocytes contiennent de très nombreuses inclusions cytoplasmiques APS positives.

Bien que le P.P.L.O. soit mis en évidence dans la synoviale au début de la maladie, l'examen histologique n'a jamais révélé de suppuration.

C — COTATION DE L'ARTHRITE

Le système de cotation est identique à celui de la polyarthrite à adjuvant (voir chapitre 3.2.1). Cependant, la nécrose ne se rencontre jamais.

3.3.2. Effets des SAL et des anti-mitotiques sur les manifestations articulaires

Cette étude d'un traitement immunosuppresseur sur cette polyarthrite infectieuse comporte deux expériences :

- la première étudie les effets du SAL anti-thymocytes et du sérum normal ;
- la seconde, ceux de l'azathioprine, du chlorambucil et du cyclophosphamide.

Les résultats figurent dans les tableaux n° 38 et n° 39, dans les courbes 7 et 8.

TABLEAU N° 38

Étude du SAL-T et du SN sur la polyarthrite à *Mycoplasma Arthritis*
Indice moyen d'arthrite au cours de l'évolution.

JOURS		J3	J6	J9	J12
TRAITEMENTS (10 rats)					
Témoins	m ± s	2,3 ± 1,7	7,1 ± 3,7	11,9 ± 7,1	9,9 ± 5,9
SAL-T (2,5 ml)	m ± s	1,2 ± 1,3 N.S.	11,0 ± 7,6 N.S.	22,1 ± 11,6 p = 0,05	14,7 ± 9,6 N.S.
SN (2,5 ml)	m ± s	4,2 ± 2,1 p = 0,05	13,5 ± 5,4 p < 0,01	21,3 ± 7,1 p < 0,01	19,6 ± 4,9 p < 0,01

Le SAL-T provoque la mort de 3 rats : l'une à J0, les autres à J19 et J20.

Courbe n° 7 Polyarthrite à Mycoplasma Arthritis

Indice d'arthrite - Sérum Anti-Lymphocytaire - (SAL)

par voie I.P.

— : Témoin
 - - - : SAL-T
 : SN

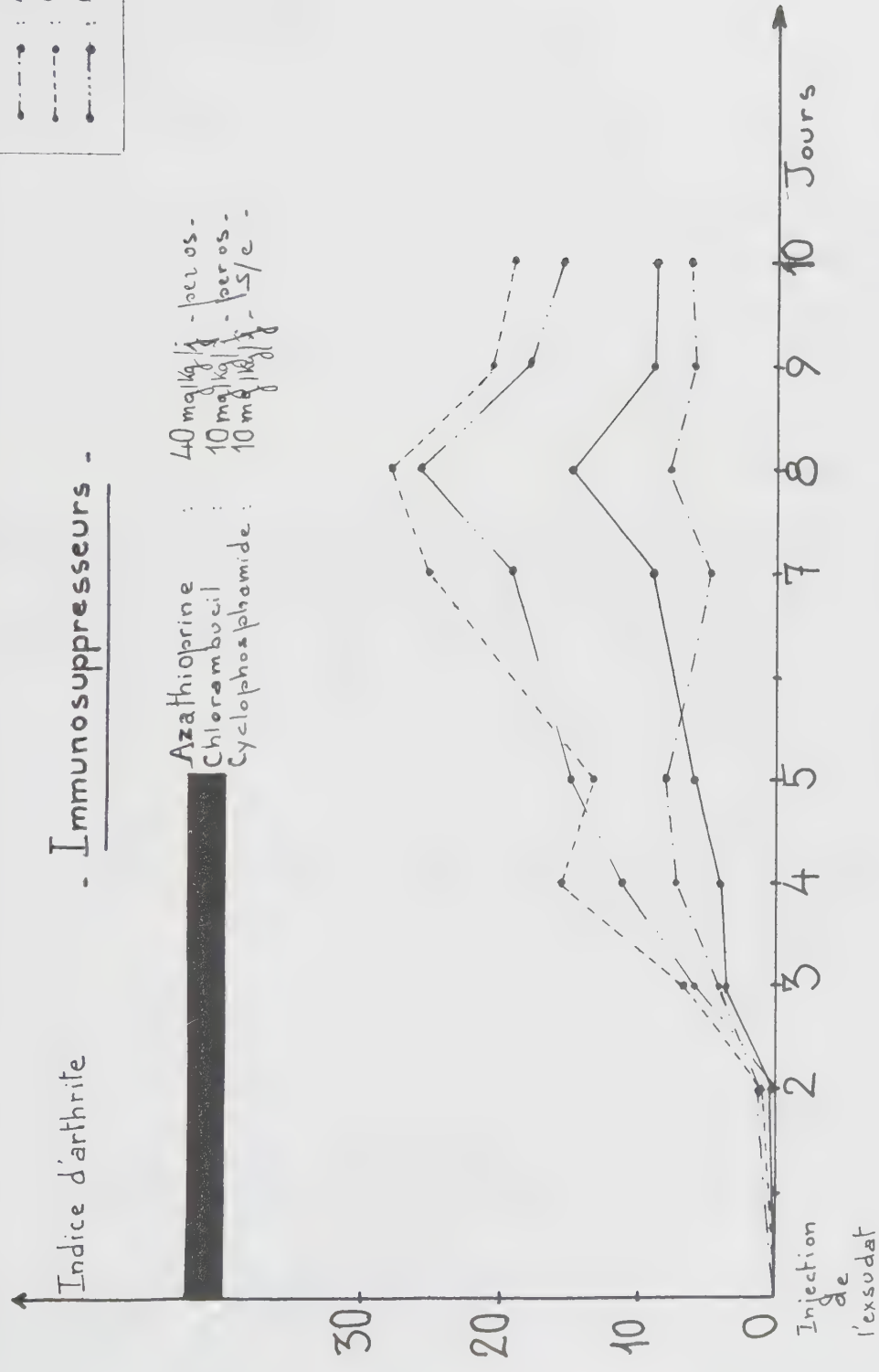


courbe n° 8 Polyarthrite à Mycoplasma Arthritis

- : Témoin
- - -•- : AZA...
- . - . - : CHLO...
- - - - - : C.P.P.

Indice d'arthrite - Immunosuppresseurs -

Azathioprine : 40 mg/kg i - per os -
Chlorambucil : 10 mg/kg i - per os -
Cyclophosphamide : 10 mg/kg i - 5/e -



Le sérum normal du lapin, augmente significativement l'indice d'arthrite des animaux traités par rapport à celui des témoins.

Le SAL anti-thymocytes augmente plus discrètement l'indice de la polyarthrite.

Les calculs sont réalisés à l'aide du test F ou W.

TABLEAU N° 39

Étude de l'azathioprine, du chlorambucil et du cyclophosphamide sur la polyarthrite à *Mycoplasma Arthritidis*.
Indice moyen d'arthrite au cours de l'évolution.

TRAITEMENTS (5 rats)		JOURS	J3	J5	J9	J10
Témoins	m ± s		3,6 ± 2,7	6,0 ± 1,9	9,0 ± 4,3	8,8 ± 3,1
AZA* . . . (40 mg/kg)	m ± s		4,0 ± 2,1 N.S.	8,2 ± 2,8 N.S.	6,0 ± 3,5 N.S.	6,3 ± 5,1 N.S.
CHLO . . . (10 mg/kg)	m ± s		6,6 ± 4,2 N.S.	13,4 ± 5,4 p = 0,05	20,6 ± 4,6 p < 0,01	19,2 ± 7,1 p = 0,02
C.P.P.* (10 mg/kg)	m ± s		6,0 ± 3,5 N.S.	15,0 ± 3,9 p < 0,01	18,0 ± 7,7 N.S.	15,7 ± 7,9 N.S.

* L'azathioprine provoque la mort de 2 rats : l'une à J7, l'autre à J8.

Le cyclophosphamide tue 1 animal à J10.

Les résultats montrent que l'effet de l'azathioprine est difficilement interprétable du fait de la mortalité de 2 rats sur 5. Néanmoins, l'azathioprine n'augmente pas l'intensité de l'indice d'arthrite des rats traités par rapport à celui des témoins.

- le chlorambucil augmente significativement l'intensité de l'arthrite tout au long de l'évolution ;
- le cyclophosphamide ne l'augmente significativement qu'entre J4 et J8.

3.3.3. Toxicité des anti-mitotiques

A – LA LETALITE

- L'azathioprine provoque la mort de 2 rats sur 5, l'une à J7, l'autre à J8. .
- Le chlorambucil n'entraîne aucune motralité.
- Le cyclophosphamide entraîne la mort de 1 rat sur 5 à J10.

B – LE POIDS CORPOREL DES RATS

La variation du poids corporel des rats entre J0 et J7 (jour de l'arrêt du traitement) figure dans le tableau n° 40

TABLEAU N° 40

Variation du poids corporel des rats traités par les anti-mitotiques

Variation J0 - J7	TÉMOINS	AZA . . .	CHLO . . .	C.P.P.
m ± s (en %)	+ 4,0 ± 3,1	– 9,2 ± 12,2	– 17,6 ± 8,5	– 19,4 ± 9,7
Comparaison avec les témoins test W		p = 0,05	p = 0,01	p = 0,01

A l'arrêt du traitement, les trois anti-mitotiques provoquent un amaigrissement significatif des rats traités par rapport aux témoins.

3.3.4. Autopsie des animaux

Macroscopiquement :

- le thymus des animaux témoins est trois à cinq fois plus volumineux que celui des rats traités par les anti-mitotiques. Les immunosuppresseurs provoquent une atrophie du thymus,
- les ganglions axillaires et inguinaux des rats témoins sont de volume plus important que ceux des animaux traités par les anti-mitotiques. De plus, les ganglions des rats traités par le cyclophosphamide sont hémorragiques. Les immunosuppresseurs provoquent une atrophie des ganglions,
- la rate : l'azathioprine ne modifie pas le poids de la rate des animaux traités par rapport à celui des témoins. Le chlorambucil et le cyclophosphamide provoquent une atrophie splénique respectivement chez 3 rats et 2 rats sur 5.

3.4. EFFET DU CYCLOPHOSPHAMIDE SUR LA MONOARTHRITE DU LAPIN INDUITE PAR UN EXSUDAT INFLAMMATOIRE HOMOLOGUE.

3.4.1. Contrôle de l'immunisation et cotation de l'arthrite

A – Le degré d'immunisation est apprécié par un test cutané. Sa lecture est réalisée 24 heures après l'injection intra-dermique et sa mesure porte sur la moyenne des diamètres minimum et maximum de l'induration.

Les résultats figurent dans le tableau n° 41.

TABLEAU N° 41

Les degrés d'immunisation et d'inflammation articulaire. Effet du cyclophosphamide.

Nature de l'injection I.A.	N° du lapin	Degré d'immunisation	Indice d'arthrite	Traitements
		Réaction cutanée (24 h) 36 jours après la 2ème immunisation	Somme des indices des deux pattes	
Exsudat homologue I.A.	5	12 mm	6	C.P.P.
	6	7 mm	4	
	7	9 mm	4	
	1	9 mm	4	s. phys.
	3	6 mm	5	
	8	16 mm	6	
Huile de croton	2	23 mm	1	C.P.P.
	4	12 mm	1	s. phys.

s. phys. = sérum physiologique.

B – Cette arthrite du genou ne se manifeste par aucun signe clinique. Son intensité, après l'injection intra-articulaire de l'antigène est cotée arbitrairement d'après les données des examens histologiques. Les cotations histologiques figurent dans le tableau n° 42.

TABLEAU N° 42

Cotations histologiques des lésions de la synoviale.

Lésions histologiques non spécifiques	Lésions histologiques spécifiques de réaction de la synoviale à un antigène local.	
COTE : 1	COTE : 2	COTE : 3
– hyperplasie villeuse hypertrophie de la couche bordante	– hyperplasie villeuse hypertrophie de la couche bordante + – Forte infiltration lymphoplasmocytaire	– hyperplasie villeuse hypertrophie de la couche bordante + – forte infiltration lymphoplasmocytaire + – follicules lymphoïdes

Ces résultats révèlent que tous les lapins immunisés ont des tests cutanés positifs.

Chez les animaux ayant reçu l'antigène par voie I.A. les indices d'arthrite les plus importants sont observés chez ceux qui développent les réactions dermiques les plus intenses.

3.4.2. Lésions histologiques de la synoviale

A – AU COURS DE L'ARTHRITE PROVOQUÉE PAR UN EXSUDAT INFLAMMATOIRE

Chez les lapins non traités

On note une hypervillosité importante et une hyperplasie de la couche bordante. Cette assise est composée de deux types de cellules : des cellules superficielles aplaties et des cellules profondes, de grande taille, APS positives, très riches en mucopolysaccharides localisés dans la zone périgolgiennne.

A côté de l'hyperplasie de la synoviale, il existe sous la couche bordante une infiltration lympho-plasmocytaire composée surtout de petits lymphocytes dont le noyau est fortement coloré par la méthode de Feulgen.

Chez les lapins traités par le cyclophosphamide, les lésions observées sont identiques à celles décrites chez les lapins témoins.

B – AU COURS DE L'ARTHRITE PROVOQUÉE PAR L'HUILE DE CROTON

On note une hyperplasie villose et une hypertrophie de la couche bordante. Les seules cellules prenant la coloration de Feulgen, sont des Fibroblastes.

Ces résultats montrent que l'huile de croton n'induit que des lésions inflammatoires non spécifiques et que la synovite avec infiltration lymphoplasmocytaire, obtenue après injection intra-articulaire d'exsudat antigénique, est bien un phénomène inflammatoire spécifique d'une réaction d'immunité cellulaire.

3.4.3. Variation du poids corporel et des données hématologiques des lapins avant et après traitement

Les résultats figurent dans les tableaux n° 43 et n°44

TABLEAU N° 43

*Étude comparée des variations du poids corporel et de l'hémogramme après 29 jours de traitement.
(moyenne et écart type : $m \pm s$)*

VARIATIONS \ NATURE DE I.A.	EXSUDAT HOMOLOGUE		HUILE DE CROTON	
	C.P.P.	s. phys.	C.P.P.	s. phys.
Nb. de lapins	3	3	1	1
Poids corporel en grammes	– 700 ± 200	+ 210 ± 60	– 840	+ 170
Hématocrite (%)	– 34 ± 5	0 ± 9	– 40	– 7
Plaquettes (%)	– 50 ± 30	0 ± 15	– 47	– 38
Leucocytes totaux (%)	– 43 ± 5	– 77 ± 35	– 29	0
Polynucléaires (%)	– 40 ± 20	+ 78 ± 80	– 70	+ 19
Cellules mononucléées (%)	– 43 ± 8	+ 81 ± 15	– 13	+ 15

TABLEAU N° 44

Nombre des lymphocytes périphériques, le jour de l'injection intra-articulaire après 29 jours de traitement.

Nb. de lapins	Nb. de lymphocytes par mm ³ (m ± s)	Traitement et dose totale par lapin
3	2.123 ± 400	C.P.P. 400 à 600 mg/kg
3	6.350 ± 900	Sérum physiologique

Ainsi, les lapins traités par le cyclophosphamide présentent une perte de poids moyenne de 34 %, une pancytopénie avec diminution de l'hématocrite (36 %), des plaquettes (49 %), des polynucléaires (48 %) et des lymphocytes (66 %).

3.4.4. Étude du liquide synovial

- La mise en culture du liquide synovial de chaque articulation injectée, sur bouillon T et gélose molle glucosée de REILLY, permet de vérifier la stérilité des arthrites obtenues.
- Les frottis du liquide articulaire, coloré au May-Grundwald-Giemsa, sont composés de 60 à 90 % de lymphocytes, 1 à 2 % de polynucléaires et 5 à 30 % de macrophages.

Cependant, les liquides synoviaux des arthrites immunologiques sont beaucoup plus riches en cellules que ceux des arthrites par l'huile de croton.

3.5. ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ CIRCULANTE

3.5.1. Effets des SAL et des anti-mitotiques

A – ÉTUDE DE LA RÉPONSE PRIMAIRE

Les résultats figurent dans les tableaux n° 45, n° 46 et n° 47.

TABLEAU N° 45

1ère expérience
Effets de l'AZA..., du CHLO... et du C.P.P. sur la réponse primaire.

TRAITEMENTS	TAUX DES ANTICORPS (m ± s)		
	J7	J14	J21
Témoins Nb. de rats	1/80 ± 1/5 10	1/160 ± 1/5 10	1/80 ± 1/5 10
AZA... (50 mg/kg/j) Nb. de rats	1/5 ± 1/5 p < 0,01 10	1/20 ± 1/10 p = 0,02 9	1/20 ± 1/10 p < 0,01 9
CHLO... (17 mg/kg/j) Nb. de rats	1/10 ± 1/10 p < 0,01 10	1/80 ± 1/5 N.S. 10	1/80 ± 1/20 N.S. 10
C.P.P. (10 mg/kg/j) Nb. de rats	0 p < 0,01 10	1/5 ± 1/10 p < 0,01 9	1/20 ± 1/10 p < 0,01 9

Les comparaisons avec les témoins sont établies à l'aide du test W.

TABLEAU N° 46

2ème expérience – Effets de 5-FU et des SAL anti-fractions subcellulaires sur la réponse primaire.

TRAITEMENTS	Nb. de rats	TAUX DES ANTICORPS (m ± s)		
		J7	J14	J21
Témoins	10	1/40 ± 1/10	1/320 ± 1/10	1/80 ± 1/5
5-FU (12,5 mg/kg)	10	1/20 ± 1/5 N.S.	1/80 ± 1/10 N.S.	1/40 ± 1/10 N.S.
SAL-MT (3,5 ml)	10	1/40 ± 1/20 N.S.	1/160 ± 1/10 N.S.	1/40 ± 1/10 N.S.
SAL-NT (3,5 ml)	10	1/40 ± 1/10 N.S.	1/80 ± 1/10 N.S.	1/40 ± 1/10 N.S.
S.N. (3,5 ml)	10	1/80 ± 1/10 N.S.	1/80 ± 1/10 N.S.	1/80 ± 1/10 N.S.

Les comparaisons avec les témoins sont établies à l'aide du test W.

TABLEAU N° 47

3ème expérience – Effets du MTX et du SAL-T sur la réponse primaire.

TRAITEMENTS	Nb. de rats	TAUX DES ANTICORPS (m ±s)		
		J7	J14	J21
Témoins	10	1/10 ± 1/5	1/20 ± 1/5	1/80 ± 1/5
MTX (0,2 mg/kg)	10	0 p < 0,01	0 p < 0,01	1/5 ± 1/5 p < 0,01
SAL-T (3,5 ml)	10	1/20 ± 1/10 N.S.	1/40 ± 1/5 N.S.	1/160 ± 1/5 N.S.

Les comparaisons avec les témoins sont établies à l'aide du test W.

Ces résultats montrent que les SAL anti-thymocytes, anti-membranes et anti-nucléoprotéines de thymocytes comme le sérum normal, n'ont aucun pouvoir inhibiteur sur la formation des anticorps anti-hématies de mouton après une première stimulation antigénique.

Parmi les cinq anti-mitotiques testés, seul le 5-fluoro uracile n'a pas de pouvoir immunodépresseur.

L'activité des autres substances se classe par ordre décroissant :

- le méthotrexate
- le cyclophosphamide
- l'azathioprine
- le chlorambucil.

B – ÉTUDE DE LA RÉPONSE SECONDAIRE

Les résultats figurent dans le tableau n° 48 ci-après.

TABLEAU N° 48
Effets des anti-mitotiques sur la réponse secondaire.

TRAITEMENTS	TAUX DES ANTICORPS (m ± s)			
	Avant la deuxième stimulation	7 jours après	14 jours après	21 jours après
Témoins (10 rats)	1/320 ± 1/5	1/320 ± 1/5	1/640 ± 1/5	1/160 ± 1/5
AZA ... (50 mg/kg) 8 rats	1/320 ± 1/5 N.S.	1/160 ± 1/5 p = 0,02	1/320 ± 1/5 N.S.	1/80 ± 1/5 p = 0,02
CHLO ... (17 mg/kg) 8rats	1/320 ± 1/5 N.S.	1/80 ± 1/5 p < 0,01	1/80 ± 1/5 p < 0,01	1/40 ± 1/10 p < 0,01
C.P.P. (10 mg/kg) 10rats	1/160 ± 1/10 N.S.	1/80 ± 1/5 p < 0,01	1/320 ± 1/5 N.S.	1/80 ± 1/5 N.S.
MTX (0,2mg/kg) 10rats	1/160 ± 1/5 N.S.	1/160 ± 1/5 N.S.	1/160 ± 1/5 p = 0,05	1/80 ± 1/5 N.S.

Les comparaisons avec les témoins sont établies avec le test W.

Ces résultats montrent que les anti-mitotiques testés possèdent un pouvoir immunodépresseur sur la réponse secondaire.

Le chlorambucil est le plus actif et son action est durable. Par contre, les trois autres anti-mitotiques ont un pouvoir immunodépresseur passager, mais des trois, le cyclophosphamide est le plus efficace.

3.5.2. Nature des anticorps

Pour déterminer la nature des anticorps anti-érythrocytes de mouton, chez le rat, nous avons utilisé le test du 2-mercaptoéthanol (2-ME).

A – 14 JOURS APRES UNE PREMIERE STIMULATION

Chez les témoins

Les résultats figurent dans le tableau n° 49

TABLEAU N° 49
Nature des anticorps formés 14 jours après une première stimulation

NB. de rats témoins	TAUX D'HÉMAGGLUTINATION (m ± s)	
	avant 2-ME	après 2-ME
45	1/160 ± 1/5	1/10 ± 1/10

Cette variation du taux d'hémagglutination avant et après 2-mercaptoéthanol, révèle que les anticorps formés 14 jours après une première injection d'hématies de mouton, sont un mélange de 19S et 7S avec une prédominance d'IgM.

B – 7, 14 et 21 JOURS APRES UNE DEUXIEME STIMULATION

Chez les témoins

Les résultats figurent dans le tableau n° 50

TABLEAU N° 50

Nature des anticorps formés 7, 14 et 21 jours après une deuxième stimulation.

Nb. de rats	TAUX D'HÉMAGGLUTINATION (m± s)							
	Avant la 2ème stimulation		7 jours après		14 jours après		21 jours après	
	AV 2-ME	AP 2-ME	AV 2-ME	AP 2-ME	AV 2-ME	AP 2-ME	AV 2-ME	AP 2-ME
10	1/320 ± 1/5	1/40 ± 1/10	1/320 ± 1/5	1/80 ± 1/10	1/640 ± 1/5	1/40 ± 1/10	1/160 ± 1/5	1/5 ± 1/10
test t			N.S.	p = 0,05	N.S.	N.S.	p < 0,01	p < 0,01

Après une deuxième stimulation, le taux global des anticorps n'augmente pas. Mais on doit noter au 7ème jour, une augmentation des 7S (IgG). A partir du 21ème jour, le taux des anticorps diminue.

Chez les rats traités par les anti-mitotiques

Les résultats figurent dans le tableau n° 51.

TABLEAU N° 51

Nature des anticorps formés 7, 14 et 21 jours après une deuxième stimulation
chez les rats traités par des anti-mitotiques.

TRAITEMENTS	TAUX D'HÉMAGGLUTINATION (m ± s)							
	Avant 2ème stimulation		Après 2ème stimulation					
			7 jours		14 jours		21 jours	
	AV 2-ME	AP 2-ME	AV 2-ME	AP 2-ME	AV 2-ME	AP 2-ME	AV 2-ME	AP 2-ME
AZA . . . (8 rats)	1/320 ± 1/5	1/10 ± 1/10	1/160 ± 1/5 p **	1/20 ± 1/10 N.S.	1/320 ± 1/5 N.S.	1/5 ± 1/5 p ***	1/80 ± 1/5 P **	0 N.S.
CHLO ... (8 rats)	1/320 ± 1/5	1/40 ± 1/10	1/80 ± 1/5 p ***	1/10 ± 1/10 N.S.	1/80 ± 1/5 p ***	0 p ***	1/40 ± 1/10 p ***	0 N.S.
C.P.P. (10 rats)	1/160 ± 1/5	1/10 ± 1/10	1/80 ± 1/5 p ***	0 p ***	1/320 ± 1/5 N.S.	1/10 ± 1/10 p *	1/80 ± 1/5 N.S.	1/5 ± 1/5 N.S.
MTX (10 rats)	1/160 ± 1/5	1/5 ± 1/10	1/160 ± 1/5 N.S.	1/20 ± 1/10 N.S.	1/160 ± 1/5 p *	1/20 ± 1/10 N.S.	1/80 ± 1/5 N.S.	1/5 ± 1/5 N.S.

p* : p = 0,05

p** : p = 0,02

p*** : p < 0,01

Les comparaisons des résultats obtenus chez les témoins (tableau n° 50) et les traités (tableau n° 51) sont faites à l'aide du test W.

Ces tableaux mettent en évidence les faits suivants :
chez les rats traités par les quatre anti-mitotiques, comme chez les témoins, le taux des anticorps IgG (7S) diminue ou s'annule au 21ème jour.

- Chez les rats traités par le chlorambucil : le taux global des anticorps anti-hématies de mouton est abaissé significativement 7, 14 et 21 jours après la deuxième stimulation. Cette variation se produit au dépens des 7 S, qui sont significativement diminués 14 jours après l'injection de l'antigène.
- Chez les rats traités par le cyclophosphamide : la diminution du taux des anticorps est passagère (7ème jour). Cependant, l'abaissement des IgG est plus prolongé (7ème et 14ème jours).
- Chez les rats traités par l'azathioprine : la diminution du taux global des anticorps est manifeste aux 7ème et 21ème jours après la stimulation. Cette variation se fait au dépens des IgG.
- Chez les rats traités par le méthotrexate : on note une diminution passagère (14ème jour) du taux des anticorps, sans modification du taux des 7S.

3.6. L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION CUTANÉE CHEZ LE RAT

3.6.1. Valeur de la méthode

A – IMPORTANCE DU LIEU DE LA TRANSPLANTATION

Les allogreffes cutanées sont réalisées dans les régions cervico-dorsale et lombo-sacrée pour la réalisation des transplantations de 1er et 2ème «set».

Les temps de survie observés dans ces différentes conditions figurent dans les tableaux n° 52 et n° 53.

TABLEAU N° 52
RÉPONSE PRIMAIRE
Importance du lieu de la transplantation

	RÉGIONS	
	cervico-dorsale	lombo-sacrée
Nb. de rats	18	72
Temps de survie (m ± s)	10,2 ± 1,1 J	9,5 ± 1,5 J
Test F	$F^1_{88} = 1,78$	Non significatif.

TABLEAU N° 53
RÉPONSE SECONDAIRE
Importance du lieu de la transplantation

	RÉGIONS		
	cervico-dorsale	lombo-sacrée	
	J15	J18-20	J30
Nb. de rats	8	5	3
Temps de survie ou amplitude en J. (m ± s)	7,1 ± 1,1	6,0 < 8,2 < 11,0	4,0 < 7,0 < 11,0
Test W	$W_{8}^{5} = 38,5$ N.S.		

Ces résultats montrent que le lieu de l’implantation de la greffe ne joue aucun rôle dans les réponses primaire et anamnétique.

B — COMPARAISON DES RÉPONSES PRIMAIRE ET SECONDAIRE

Le temps de survie des greffes de 1er et 2ème «set» figurent dans le tableau n° 54

TABLEAU N° 54
*Comparaison du temps de survie des allogreffes de 1er et 2ème «set»,
(dans la région lombo-sacrée).*

GREFFES DE	1er «SET»	2ème «SET»
Nb. de rats	18	8
Temps de survie moyen et amplitude	8,0 < 10,2 jours < 12,0	5,0 < 7,1 jours < 8,0
Test F	$F_{24}^1 = 38,26$	p < 0,01

Ce résultat confirme la valeur de notre technique d’allogreffe cutanée chez le rat. Le temps de la réponse anamnétique est significativement plus court que celui de la réponse primaire. La première greffe a donc induit un état d’immunité.

3.6.2. Essai des traitements immunosuppresseurs

Dans toutes ces études, les comparaisons sont faites à l'aide du test W.

A – ÉTUDE DES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES

Sur la réponse primaire

Les résultats figurent dans le tableau N° 55

TABLEAU N° 55
Temps de survie des allogreffes cutanées de 1er «set» traitées par le SAL

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Quantité totale	Temps de survie Moyenne et amplitude en jours
Témoins	18	de 4 à 7 ml	8,0 < 10,2 < 12,0
SAL-T	6	4 ml	10,0 < 12,5 < 15,0 p < 0,01
	6	* 7 ml	11,0 < 13,3 < 14,0 p < 0,01
SAL-MT	5	3 ml	9,0 < 9,8 < 11,0 N.S.
	10	4 ml	10,0 < 11,1 < 12,0 p < 0,05
SAL-NT	5	4 ml	9,0 < 10,2 < 11,0 N.S.
SN	6	4 ml	9,0 < 9,7 < 12,0 N.S

* Le sérum est injecté avant et après la transplantation (dans les autres expériences, le traitement est commencé le jour de la greffe).

Seuls les SAL anti-thymocytes et SAL anti-membranes de thymocytes possèdent un pouvoir immunodépresseur. Ce pouvoir est similaire pour les deux sérums.

Sur la réponse secondaire

Les résultats figurent dans le tableau n° 56

TABLEAU N° 56
Temps de survie des allogreffes cutanées de 2ème «set» traitées par les SAL

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Quantité totale	Temps de survie Moyenne et amplitude en jours
Témoins	8	2 à 6 ml	5,0 < 7,1 < 8,0
SAL-T	4	2 ml	9,0 = 9,0 = 9,0 p < 0,01
	5	6 ml	8,0 < 9,2 < 10,0 p < 0,01
SAL-MT	5	2 ml	8,0 < 8,6 < 9,0 p = 0,02
SAL-NT	5	2 ml	4,0 < 7,6 < 12,0 N.S.
SN	5	2 ml	4,0 < 6,4 < 8,0 N.S.
	5	5 ml	8,0 = 8,0 = 8,0 N.S.

Le SAL anti-thymocytes et le SAL anti-membranes de thymocytes dépriment aussi bien la réponse anamnétique que la réponse primaire d'immunité de greffe.

Ces résultats confirment l'inefficacité du SAL anti-nucléoprotéines et du sérum normal de lapin.

B – ÉTUDE DES ANTI-MITOTIQUES

Sur la réponse primaire

Les résultats figurent dans le tableau n° 57.

TABLEAU N°57

Temps de survie des allogreffes cutanées de 1er «set» traitées par les anti-mitotiques.

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Dose moyenne en mg/kg/j.	Temps de survie Moyenne et amplitude en jours
Témoins	18		8,0 < 10,2 < 12,0
AZA . . .	5	20,0	10,0 < 11,8 < 14,0 N.S.
CHLO . . .	10	8,0	13,0 < 18,6 < 28,0 p < 0,01
C.P.P.	10	10,0	10,0 < 22,4 < 33,0 p < 0,01
5-FU	6	12,5	10,0 < 12,3 < 14,0 p < 0,01
MTX	5	0,1	8,0 < 9,8 < 11,0 N.S.

Dans toutes les expériences, le traitement est commencé le jour de la transplantation.

Les deux alkylants et le 5-fluoro uracile prolongent significativement le temps de survie des allogreffes cutanées. Le pouvoir immunodépresseur des deux alkylants est nettement supérieur à celui du 5-FU.

Sur la réponse secondaire

Les résultats figurent dans le tableau n° 58.

TABLEAU N° 58

Temps de survie des allogreffes cutanées de 2ème «set» traitées par les anti-mitotiques.

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Dose moyenne en mg/kg/j.	Temps de survie Moyenne et amplitude en jours
Témoins	8		5,0 < 7,1 < 8,0
CHLO . . .	6	8	8,0 < 16,5 < 22,0 p < 0,01
C.P.P.	6	10	8,0 < 11,3 < 14,0 p < 0,01

Les deux alkylants prolongent significativement le temps de survie des greffes de 2ème «set». Mais le pouvoir immunodépresseur du chlorambucil est supérieur à celui du cyclophosphamide.

Étude de la tolérance immunologique acquise

Les expériences précédentes révèlent les pouvoirs immunodépresseurs puissants du chlorambucil et du cyclophosphamide. Ce résultat nous a incités à rechercher leur capacité d'induire un état de tolérance.

Les résultats figurent dans le tableau n° 59.

TABLEAU N° 59

Temps de survie des allogreffes cutanées de 2ème «set».
Le traitement, commencé le jour de la première stimulation, est arrêté 6 jours avant la deuxième.

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Dose moyenne en mg/kg/j.	Temps de survie Moyenne et amplitude en jours
Témoins	5		6,0 < 8,2 < 11,0
CHLO ...	3	8	10,0 < 15,7 < 22,0 p = 0,05
C.P.P.	4	10	8,0 < 10,2 < 15,0 N.S.

Malgré la petite taille de l'échantillon, il est possible de mettre en évidence un état de tolérance immunologique transitoire chez les rats traités par le chlorambucil.

3.7. ÉTUDE COMPARÉE DES PROPRIÉTÉS ANTI-INFLAMMATOIRES ET DES EFFETS CYTOTOXIQUES DES IMMUNOSUPPRESSEURS.

3.7.1. Étude de la phase précoce de la réaction inflammatoire :

L'OEDEME A LA CARRAGÉNINE

A – VALEUR DU TEST :

La patte œdématiée est le siège d'une vasodilatation artériolaire et l'on peut noter une prolifération des cellules sanguines et une exsudation dans les espaces périvasculaires.

B – ESSAI DU SAL ET DES ANTI-MITOTIQUES

– le SAL-T

Les résultats figurent dans le tableau n° 60.

TABLEAU N° 60

Effet préventif du SAL-T sur l'œdème à la carragénine.

TRAITEMENTS (10 rats)	% d'augmentation du volume de la patte	
	m ± tsm	% V ÷ T
Témoins	70,30 ± 12,16 %	
SAL-T (2 ml)	65,30 ± 8,04 % N.S.	– 6 %
SN (2 ml)	64,10 ± 11,21 % N.S.	– 9 %

Nous avons étudié simultanément l'effet d'une telle dose sur les cellules sanguines (numération différentielle au bleu de crésyl).

Les résultats figurent dans le tableau n° 61.

TABLEAU N° 61

Étude de la numération globulaire dans le sang périphérique.

Trait.	Nb. de rats	Nb. *des polynucléaires/mm3			Nb.* des cellules mononucléées/mm3		
		Avant	Après	% V	Avant	Après	% V
T	5	$\frac{700}{940}$ 1 700	$\frac{780}{1\,030}$ 1 500	+ 9 %	$\frac{7\,900}{12\,010}$ 19 200	$\frac{7\,950}{13\,560}$ 18 650	+ 13 %
SAL-T	5	$\frac{700}{960}$ 1 100	$\frac{800}{1\,080}$ 1 550	+ 12 %	$\frac{10\,050}{12\,850}$ 16 200	$\frac{3\,650}{4\,990}$ 6 200	- 61 %

*(moyenne et amplitude)

Administré à la dose de 2 ml par rat, 4 heures avant l'injection phlogogène, le SAL-T provoque une forte diminution du nombre des cellules mononucléées, sans modifier celui des polynucléaires. Dans ces conditions, il n'y a pas d'action anti-œdémateuse.

— les anti-mitotiques

Cette étude comporte quatre expériences. Les anti-mitotiques sont administrés quotidiennement 6 à 7 fois avant l'injection phlogogène, parfois, 1 heure avant (*).

L'effet des anti-mitotiques sur l'œdème à la carragénine figurent dans les tableaux n° 62, n° 63, n° 64, et n° 65.

TABLEAU N° 62

Effet préventif de l'azathioprine sur l'œdème à la carragénine.

TRAIT.	Nb. de rats	Dose moyenne/j	% d'augmentation du volume de la patte	
			m ± tsm	% V ÷ T
AZA ... (per os)	19	40 mg/kg	73,89 ± 7,73 % N.S.	+ 13 %
T	20		65,35 ± 6,02 %	

TABLEAU N° 63

Effet préventif du chlorambucil sur l'œdème à la carragénine.

TRAIT.	Nb. de rats	Dose moyenne/j.	% d'augmentation du volume de la patte	
			m ± tsm	% V ÷ T
CHLO...* (per os)	20	mg / kg 2	66,50 ± 5,98 % N.S.	+ 7 %
	20	4	65,25 ± 5,33 % N.S.	+ 5 %
	20	8	51,30 ± 9,97 % p = 0,05	- 34 %
T*	20		62,30 ± 4,85 %	

TABLEAU N° 64

Effet préventif du chlorambucil et du cyclophosphamide sur l'œdème à la carragénine.

Trait.	Nb. de rats	Dose moyenne par jour	% d'augmentation du volume de la patte	
			m ± tsm	% V ÷ T
CHLO... (per os)	9	8,33	22,44 ± 7,78 % p = 0,01	– 65 %
C.P.P. (S/C)	9	10,00	58,22 ± 21,67 % N.S.	– 10 %
T	10		64,50 ± 9,20 %	

TABLEAU N° 65

Effet préventif du méthotrexate et du 5-Fluoro uracile sur l'œdème à la carragénine.

Trait.	Nb. de rats	Dose moyenne par jour	% d'augmentation du volume de la patte	
			m ± tsm	% V ÷ T
MTX* (per os)	10	mg/kg 0,2	70,50 ± 10,30 % N.S.	+ 2 %
5-FU* (S/C)	10	12,5	62,40 ± 12,75 % N.S.	– 10 %
T*	10		69,40 ± 10,76 %	

Des cinq substances, seul le chlorambucil possède une action anti-œdémateuse qui ne se manifeste qu'à partir de la dose de 8 mg/kg/j. Aux doses utilisées, les quatre autres anti-mitotiques sont dénués d'effet anti-phlogistique.

3.7.2. Étude de la prolifération histio-fibroblastique au cours de la réaction inflammatoire.

Le test du pellet d'ivalon

A – VALEUR DU TEST

L'étude histologique de l'implant porte sur le pellet et sa coque prélevés en bloc au 8ème jour d'évolution (23). On distingue deux zones différentes :

- dans l'épaisseur du pellet, les mailles de l'éponge sont remplies par un exsudat sérofibrineux, très peu cellulaire, occupé seulement par quelques polynucléaires ;
- dans la zone périphérique au contraire, les mailles superficielles contiennent des bourgeons de tissu fibroblastique jeune, émanés de la coque réactionnelle périphérique. Ces bourgeons sont constitués par des fibroblastes étalés disposés assez lâchement avec de rares cellules inflammatoires, quelques macrophages unis ou multinucléolés et nombreuses sections de capillaires néoformés.
- Lorsque cette méthode est utilisée comme test pharmacologique, le pellet est disséqué de sa coque conjonctive au bout de 8 jours d'évolution et les calculs portent sur le poids sec du pellet.

B – ESSAI DES ANTI-MITOTIQUES ET DU SAL :

– le SAL-T

Le SAL-T, le SN et le sérum physiologique sont administrés avant la stimulation phlogogène et durant l'évolution de la réaction inflammatoire.

Les résultats figurent dans le tableau n° 66

TABLEAU N° 66
Effets préventif et curatif du SAL-T sur le pellet d'ivalon.

TRAITEMENTS (10 rats)	Poids de colonisation cellulaire	% V ÷ T
	m ± tsm	
T s. phy.	30,85 ± 3,12 mg	
SAL-T (6 ml)	31,25 ± 3,84 mg N.S.	+ 1 %
SN (6 ml)	35,10 ± 6,44 mg N.S.	+ 14 %

La dose totale de 6 ml de SAL-T a très vraisemblablement un effet lymphopéniant. Mais les résultats révèlent que dans ces conditions, le SAL-T comme le SN, sont incapables de modifier l'intensité de la prolifération fibroblastique des rats traités par rapport à celle des témoins.

— les anti-mitotiques

Cette étude comporte deux types d'expériences :

- l'une recherche l'effet des médicaments administrés préventivement,
- l'autre curativement.

ÉTUDE DES EFFETS PRÉVENTIFS

Les résultats figurent dans le tableau n° 67

TABLEAU N° 67
Effet préventif de l'azathioprine, du chlorambucil et du cyclophosphamide sur le pellet d'ivalon.

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Poids de colonisation cellulaire	% V ÷ T
		m ± tsm	
Témoins	5	28,00 ± 6,42 mg	
AZA ... (40 mg/kg)	5	25,20 ± 5,00 mg N.S.	— 10 %
CHLO... (10 mg/kg)	5	27,95 ± 6,28 mg N.S.	— 2 %
C.P.P. (12 mg/kg)	2	21,50 mg	— 23 %

Ces résultats montrent que l'azathioprine et le chlorambucil n'ont pas d'action sur la phase cellulaire tardive de la réaction inflammatoire. Les effets du cyclophosphamide sont difficilement interprétables, du fait de la mort de 3 rats sur 5.

ÉTUDE DES EFFETS CURATIFS

Cette recherche comporte trois expériences dont les résultats figurent dans le tableau n° 68 ci-après.

TABLEAU N° 68
Effet curatif des anti-mitotiques sur le pellet d'ivalon.

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Poids de colonisation cellulaire	% V ÷ T
		m ± tsm	
Témoins	15	28,65 ± 3,42 mg	
AZA ... (40,0 mg/kg)	15	26,73 ± 3,14 mg N.S.	— 7 %
CHLO ... (10,0 mg/kg)	15	14,97 ± 2,24 mg p < 0,01	— 48 %
C.P.P. (12,0 mg/kg)	15	20,93 ± 3,20 mg p < 0,01	— 27 %

Témoins	10	28,10 ± 4,40 mg	
5-FU (12,5 mg/kg)	10	27,35 ± 4,88 mg N.S.	— 3 %

Témoins	20	25,60 ± 2,86 mg	
MTX (0,2 mg/kg)	20	19,45 ± 3,05 mg p = 0,01	— 24 %

Des cinq anti-mitotiques étudiés, nous remarquons les effets anti-inflammatoires des deux alkylants et du MTX. Leur action inhibitrice de la prolifération histiofibroblastique se classe par ordre décroissant :

- le chlorambucil (— 48 %)
- le cyclophosphamide (— 27 %)
- le méthotrexate (— 24 %)

3.7.3. Étude de la synthèse des mucopolysaccharides et du tissu collagène au cours de la réaction inflammatoire :

Le test du granulome à la carragénine

A — VALEUR DU TEST

L'étude histologique des granulomes est réalisée 8 jours après l'injection de carragénine. On constate sur certains fragments, une cavité centrale contenant un liquide d'aspect séreux, pauvre en cellules inflammatoires polymorphes et parfois altérées.

Cette cavité est entourée d'une zone fibrino-polynucléaire peu étendue. Plus superficiellement, on trouve une zone granulomateuse à prédominance histiocytaire d'aspect macrophagique le plus souvent. Entre les cellules, on note la présence d'un réseau collagène nettement développé. Les capillaires néo-formés sont nombreux, surtout dans la zone marginale. La coloration de HOTCHKISS MAC MANUS montre que le cytoplasme des cellules macrophagiques du granulome est fortement APS positif.

B — ESSAI DES ANTI-MITOTIQUES

Cette étude comporte deux expériences dont les résultats figurent dans le tableau n° 69 ci-après.

TABLEAU N° 69

Effet curatif des anti-mitotiques sur le test du granulome à la carragénine.

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Poids du granulome sec	% V ÷ T
		m ± tsm	
Témoins	8	133,25 ± 32,31 mg	
AZA ... (40,0 mg/kg)	10	125,40 ± 19,52 mg N.S.	– 6 %

TRAITEMENTS	Nb. de rats	Poids du granulome sec	% V ÷ T
		m ± tsm	
Témoins	20	181,65 ± 33,79 mg	
CHLO ... (9,0 mg/kg)	19	122,63 ± 20,58 mg p < 0,01	– 32 %
C.P.P. (10,0 mg/kg)	20	167,65 ± 29,78 mg N.S.	– 8 %
MTX (0,2 mg/kg)	20	209,90 ± 43,18 mg N.S.	+ 15 %

Seul le chlorambucil est doué de propriété anti-granulomateuse

3.7.4. Étude de la cytotoxicité des anti-mitotiques

A – RECHERCHE DE L’EFFET CYTOTOXIQUE DES MÉDICAMENTS

Sur l’hémogramme

Les effets de l’azathioprine, du chlorambucil et du cyclophosphamide figurent dans le tableau n° 70. L’étude porte sur 5 rats par lot expérimental.

TABLEAU N° 70

Effet cytotoxique des anti-mitotiques sur l’hémogramme.

Variation avant et après 7 injections	AZA ...	CHLO...			C.P.P.
Dose en mg/kg	40	2	4	8	10
Nb. de leucocytes totaux	0	–	–	–	–
Nb. des polynucléaires	0	0	–	–	–
Nb. des cellules mononucléées	0	–	–	–	–
% Polynucléaires neutrophiles	0	0	+	–	–
% Petits lymphocytes	0	–	–	–	–
% Grands lymphocytes	0	0	0	–	–
% Monocytes	0	+	+	–	–

+ : augmentation 0 : pas de modification – : diminution

Sur le myélogramme

Les effets du chlorambucil aux doses de 2, 4 et 8 mg/kg/j figurent dans le tableau n° 71.
L'étude porte sur 3 rats par dose.

TABLEAU N° 71
Effets du chlorambucil sur le myélogramme.

Variation avant et après 7 injections	CHLORAMBUCIL		
	2 mg/kg	4 mg/kg	8 mg/kg
Cellularité	0	0	—
Cellules souches monocytoides	0	+	0
Cellules réticulaires	0	+	0
Myéloblastes	0	0	0
Promyélocytes	0	0	+
Myélocytes	0	+	+
Métamyélocytes	—	0	+
Polynucléaires	0	—	0
Lymphocytes	0	—	—
Monocytes	0	0	+
Proérythroblastes	0	+	0
Erythroblastes basophiles	0	+	—
Erythroblastes polychromatophiles	0	+	—
Erythroblastes acidophiles	0	+	—

+ : augmentation

0 : pas de modification

— : diminution

B - RECHERCHE DES MODIFICATIONS HÉMATOLOGIQUES LIÉES A LA RÉACTION PHLOGOGENE SOUS TRAITEMENT IMMUNOSUPPESSEUR.

Sur l'hémogramme

Les effets de l'azathioprine, du chlorambucil et du cyclophosphamide figurent dans le tableau n°72.

L'étude porte sur 9 rats par lot expérimental.

TABLEAU N° 72

Modifications du leucogramme liées à la réaction phlogogène sous traitement.

Variation avant et après 7 injections	Témoins	AZA ...	CHLO ...	C.P.P.
Dose en mg/kg		40	10	12
Nb. de leucocytes totaux	0	0	—	—
Nb. des polynucléaires	0	0	—	—
Nb. de cellules mononucléées	0	0	—	—
% Polynucléaires neutrophiles	0	0	—	+
% Petits lymphocytes	0	0	—	—
% Grands lymphocytes	0	0	—	0
% Monocytes	0	0	—	—

+ : augmentation

0 : pas de modification

— :diminution

Sur le myélogramme

Les effets de l'azathioprine, du chlorambucil et du cyclophosphamide figurent dans le tableau n°73.
L'étude porte sur 9 rats par lot expérimental.

TABLEAU N° 73

Modifications du myélogramme liées à la réaction phlogogène sous traitement.

Variation avant et après 7 injections	T	AZA ... 40 mg/kg	CHLO... 10 mg/kg	C.P.P. 12 mg/kg
Cellularité	0	0	—	—
Cellules souches monocytoïdes	0	0	+	+
Cellules réticulaires	0	0	0	0
Myéloblastes	0	0	0	+
Promyélocytes	0	0	0	+
Myélocytes	0	0	+	+
Métamyélocytes	0	0	+	0
Polynucléaires	0	0	0	0
Lymphocytes	0	0	—	—
Monocytes	0	0	0	—
Proérythroblastes	0	0	0	0
Erythroblastes basophiles	0	0	0	0
Erythroblastes polychromatophiles	0	0	—	0
Erythroblastes acidophiles	0	0	0	+

+ : augmentation

0 : pas de modification

— : diminution

C – RECHERCHE DES ALTÉRATIONS HÉMATOLOGIQUES LIÉES A LA RÉACTION PHLOGOGENE 8 JOURS APRES L'ARRET DU TRAITEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR.

Sur l'hémogramme

Les effets de l'azathioprine, du chlorambucil et du cyclophosphamide figurent dans le tableau n°74.

L'étude porte sur 3 rats par lot expérimental.

TABLEAU N° 74

*Modifications du leucogramme liées à la réaction phlogogène,
8 jours après l'arrêt du traitement.*

Variation avant (J – 8) et après (J + 8)	AZA ...	CHLO ...	C.P.P.
Dose en mg/kg	40	10	12
Nb. de leucocytes totaux	0	–	–
Nb. de polynucléaires	0	–	–
Nb. de cellules mononucléées	0	–	–
% Polynucléaires neutrophiles	0	+	+
% Petits lymphocytes	0	–	–
% Grands lymphocytes	0	0	0
% Monocytes	0	0	0

+ : augmentation

0 : pas de modification

– : diminution

Sur le myélogramme

Les effets de l'azathioprine, du chlorambucil et du cyclophosphamide figurent dans le tableau n° 75. L'étude porte sur 3 rats par lot expérimental.

TABLEAU N° 75
*Modifications du myélogramme liées à la réaction phlogogène,
8 jours après l'arrêt du traitement.*

Variation avant (J - 8) et après (J + 8)	AZA ...	CHLO ...	C.P.P.
Dose en mg/kg/j	40	10	12
Cellularité	0	—	—
Cellules souches monocytoïdes	+	+	+
Cellules réticulaires	0	+	0
Myéloblastes	0	0	0
Promyélocytes	0	0	+
Myélocytes	0	+	+
Métamyélocytes	0	+	+
Polynucléaires	0	+	+
Lymphocytes	—	—	—
Monocytes	+	0	—
Proérythroblastes	0	0	0
Erythroblastes basophiles	0	0	0
Erythroblastes polychromatophiles	0	—	—
Erythroblastes acidophiles	0	—	0

+: augmentation

0 : pas de modification

— : diminution

— Les données hématologiques des rats non traités qui figurent dans les tableaux n° 72 et 73, soulignent l'absence de modifications sanguine et médullaire liées à la réaction phlogogène.

— Quelles que soient les modalités du traitement, nous avons observé les faits suivants :

L'AZATHIOPRINE à la dose de 40 mg/kg/j. administrée 7 fois, est pratiquement dénué de toxicité (1 mort sur 40 rats). Il ne modifie ni le leucogramme, ni le myélogramme. Les rats ainsi traités ne maigrissent pas ou peu. Par rapport aux témoins, leur courbe de croissance pondérale est aplatie.

Le **CHLORAMBUCIL** aux doses de 2, 4 et 8 mg/kg par jour administrées 7 fois, n'entraîne aucune létalité sur 20 rats. Le taux d'inhibition de la croissance pondérale est fonction de la dose.

- la dose de 2 mg/kg induit une lymphopénie périphérique et isolée, sans modification du myélogramme;
- la dose de 4 mg/kg provoque dans le sang une lymphopénie intense et une discrète neutropénie ; dans la moëlle, la lymphopénie est nette;
- la dose de 8 mg/kg provoque dans le sang une leucopénie globale et sévère, dans la moëlle une hypocellularité, une lymphopénie, une érythroblastopénie sans altérer le taux des cellules souches;
- les doses supérieures provoquent une aplasie médullaire irréversible.

Le **CYCLOPHOSPHAMIDE**

— à la dose de 10 mg/kg administrée 7 fois, le cyclophosphamide provoque la mort de 3 rats sur 10 et inhibe la croissance pondérale normale. Sur le plan hématologique, il provoque une leucopénie globale intense.

— à la dose de 12 mg/kg injectée 7 fois, le cyclophosphamide provoque la mortalité de 2 rats sur 20, un amaigrissement important des animaux et sa toxicité se traduit par une pancytopénie importante dans le sang périphérique ; une hypocellularité avec lymphopénie intense et monocytopenie dans la moëlle. Le taux des cellules souches est respecté.

4 - DISCUSSION

4 – DISCUSSION

Ce travail étudie les effets des immunosuppresseurs et des sérums anti-lymphocytaires sur trois modèles d'arthrite et polyarthrites expérimentales :

- la polyarthrite du rat à adjuvant et la monoarthrite du genou du lapin induite par un exsudat inflammatoire homologue qui se traduisent par une réaction phlogogène secondaire à un conflit immunologique ;
- la polyarthrite du rat à mycoplasma arthritidis, d'origine infectieuse, et dont le germe responsable est un antigène capable d'induire une réaction immunitaire.

Nous avons choisi ces modèles parce qu'ils présentent des analogies avec certains rhumatismes inflammatoires immunologiques.

LA MALADIE A ADJUVANT DU RAT

Décrite en 1956 par PEARSON (114), réalise une affection systémique comportant des manifestations articulaires et viscérales.

Cette polyarthrite qui touche essentiellement les extrémités en peau glabre, présente des analogies avec les atteintes articulaires de la maladie rhumatoïde (M.R.) (82-84-85-117-120-122), et du syndrome de FIESSINGER-LEROY-REITER (syndrome F.L.R.) (117 et 120). Les atteintes du rachis chez l'animal évoquent la spondylarthrite ankylosante (S.P.A.) (117 et 120).

La polyarthrite à adjuvant est caractérisée par une évolution chronique, avec des poussées inflammatoires récurrentes qui aboutissent à des lésions trophiques évolutives articulaires, péri-articulaires et osseuses. Nous retrouvons ce même aspect dans la M.R.

L'atteinte uro-génitale, la diarrhée, l'iritis et la conjonctivite sont communes à la maladie expérimentale et au syndrome F.L.R.

La polyarthrite à adjuvant, comme la M.R., le syndrome F.L.R. et la S.P.A., comportent à des degrés divers deux types de lésions inflammatoires de la synoviale et des tissus péri-articulaires :

- des lésions non spécifiques : infiltration à cellules de type histiocytaire, prolifération fibroblastique, hypervillosité et hyperplasie de la couche bordante, pannus péri et intra-articulaire ;
- d'autres, spécifiques d'une réaction du tissu conjonctif à un antigène : follicules lymphoïdes, rares dans la maladie à adjuvant, exceptionnels dans le syndrome F.L.R., très fréquents dans la M.R.

: infiltrats lymphocytaires

trouvés à la fois dans la M.R. et la maladie à adjuvant.

Cette polyarthrite à adjuvant se manifeste par les signes biologiques d'une inflammation non spécifique : diminution de l'albumine, augmentation des alpha-1 et alpha-2 glycoprotéines sériques (82, 83, et 167). La vitesse de sédimentation accélérée, s'accompagne d'une anémie sidéropive (94-99-100). Nous avons constaté comme WALZ (151) dans le sang, une hyperleucocytose avec polynucléose neutrophile importante et comme MIKOLAJEW (99) dans la moëlle, une hypercellularité avec augmentation du taux des cellules souches et des éléments de la série myélocytaire. Quantitativement, les érythroblastes ne sont pas modifiés, mais ils ont un aspect ferriprive. Une telle anémie et l'hyperleucocytose sont présentes dans la M.R.

Jusqu'à maintenant, dans la polyarthrite à adjuvant et la M.R., toutes les tentatives de mise en évidence d'un germe (61-62-115-121-143) ou d'un virus (78 et 79) ont échoué. Mais l'on doit signaler que les inducteurs de l'interféron atténuent cette maladie du rat (78 et 79). Par contre, SCHACHTER (139) et AMOR (3) ont montré récemment que le syndrome F.L.R. est secondaire à une infection à *Bedsonia* ainsi que certaines S.P.A.

La pathogénie de la maladie à adjuvant n'est pas entièrement élucidée. Diverses hypothèses sont émises, mais la plus valable, est celle qui admet que cette polyarthrite est une réaction d'hypersensibilité retardée. De nombreux arguments plaident en faveur d'une pathogénie immunologique.

- 1 - la maladie serait la traduction d'une stimulation par un composé antigénique de la cire D de mycobactéries (125-126-167) ;
- 2 - la réinoculation de l'antigène peut parfois provoquer une récurrence de l'arthrite dont la période de latence est plus courte (7 jours) (61-62-85-115). Dans notre expérience, nous n'avons pas obtenu de rebond de la polyarthrite mais une aggravation nette de l'état général des rats, probablement due à un effet toxique de l'adjuvant à fortes doses ;
- 3 - elle n'apparaît pas chez le receveur rendu immunologiquement tolérant pendant la période néo-natale (115) ;
- 4 - elle peut être induite chez le rat thymectomisé (74) (135) ou splénectomisé (135) à l'âge adulte. Cependant, chez les animaux atteints de polyarthrite, le thymus est diminué de volume et présente des signes histologiques d'involution (74) ;
- 5 - l'intégrité du système lymphatique est nécessaire à l'induction de la maladie (72-106-135-152). la suppression de la polyarthrite par déplétion lymphocytaire (canulation du canal thoracique) (160), ou SAL (29-30-31-129), confirme l'importance de l'appareil lymphatique dans la genèse de cette maladie ;
- 6 - la polyarthrite peut être supprimée par compétition antigénique (37-50-51-65-118-124) ;
- 7 - les arguments en faveur d'une hypersensibilité retardée (46-115-116-119-148) sont nombreux : période de latence de 10 à 12 jours (115), transfert de la maladie par les lymphocytes de donneurs sensibilisés (123-149-150), réaction tuberculinique positive (77-153-154) et transformation blastique des lymphocytes de rats polyarthritiques en présence de tuberculine, histologiquement (25-26-73-115-120) : infiltrats lymphocytaires avec nodules lymphoïdes, cliniquement : évolution cyclique avec poussées inflammatoires récurrentes (62-82-115).

Le rôle d'une réaction d'immunité humorale ne peut être formellement exclu (167). Bien que nos tentatives de mise en évidence d'anticorps circulants anti-mycobactériens aient échoué, LOWE (93) et FORMANEK (47) ont montré une élévation transitoire des immunes globulines pendant la période d'invasion. Durant la phase de pleine évolution, les gamma-globulines ne sont pas modifiées (82-83-84).

Malgré les analogies avec la M.R., le syndrome F.L.R. et la S.P.A., la polyarthrite à adjuvant demeure un modèle expérimental qui ne tient pas compte de toute la complexité des grands rhumatismes inflammatoires. En particulier, chez les rats arthritiques, la sérologie rhumatoïde est négative (47-82-115) et jamais, il n'a pu être mis en évidence de désordres immunologiques en faveur d'un processus auto-immun (82). Cependant, le mode évolutif est celui observé dans les maladies inflammatoires auto-entretenues.

Nous estimons toutefois, que ce modèle expérimental est actuellement le plus intéressant de tous ceux existants. Sa réalisation est relativement simple et reproductible, de plus, avec les adjuvants que nous avons mis au point, nous obtenons une polyarthrite dans cent pour cent des cas.

Un tel modèle est utilisé depuis plusieurs années comme test pharmacologique pour l'étude des substances anti-rhumatismales (165) : anti-inflammatoires (105-107-155), anti-paludéens de synthèse (105-155), sels d'or (71-105), oestrogènes (53-104), immunosuppresseurs (24-53-54-77-129-130-131-154) et les sérums anti-lymphocytaires (29-30-31-129).

LA POLYARTHRITE A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS

Pour réaliser ce modèle expérimental, nous avons modifié la technique décrite par JASMIN (70) en 1957, en particulier, nous avons induit la polyarthrite chez les rats non surrénalectomisés.

Cette polyarthrite apparaît dans le cadre d'une septicémie à P.P.L.O. (2) et la maladie peut être inhibée par immunisations passive et active (75-76).

Sur le plan clinique, il s'agit d'une arthrite très inflammatoire, d'évolution brève, ne récidivant pas et qui laisse comme séquelles, une ankylose fibreuse des articulations. Cette polyarthrite touche les extrémités en peau glabre d'où, une certaine analogie avec la M.R. (les ressemblances avec les rhumatismes humains se limitent à ce symptôme). En effet, il n'y a pas de lésions viscérales et les lésions histologiques sont celles d'une synovite non spécifique.

L'intérêt d'un tel modèle est de réaliser une arthrite septique comme on en rencontre en clinique humaine. En effet, les antibiotiques à larges spectres comme les tétracyclines, inhibent la polyarthrite par leur action bactériostatique sur le P.P.L.O. (35-69-70).

Le principal inconvénient de cette maladie expérimentale, réside dans la complexité des manipulations pour un succès qui reste inconstant. Enfin, les animaux polyarthritiques sont fragiles et les mortalités sont fréquentes.

LA MONOARTHRITE DU LAPIN TYPE GLYNN.

L'utilisation du protocole expérimental mis au point par GLYNN et COLL. (127), nous a permis de réaliser une affection inflammatoire, immunologique, auto-entretenu, évoluant par poussées pendant plusieurs années.

Histologiquement, les lésions de la synoviale sont pratiquement identiques à celles constatées dans la M.R. En effet, à côté des lésions non spécifiques de synovite inflammatoire : hyperplasie de la couche bordante, hypertrophie des villosités, hypercellularité, on retrouve des lésions spécifiques d'une réaction de la synoviale à un antigène local : infiltration lymphocytaire, pouvant aboutir à la constitution de véritables follicules lymphoïdes sans centre germinatif.

Au cours de l'évolution, comme dans la M.R., l'hypervillosité de la synoviale donne naissance à des pannus extensifs qui détruisent d'abord le cartilage, puis l'os sous-chondral.

Cette arthrite est secondaire à une réaction d'hypersensibilité retardée.

En effet, les lapins dont les réactions cutanées sont les plus intenses ont développé les indices d'arthrite les plus importants, bien que l'injection déclenchante soit faite trois mois et demi après la deuxième immunisation.

Une telle arthrite peut être reproduite par de nombreux antigènes. GLYNN et COLL. l'ont montré avec la fibrine (41) et l'ovalbumine (55). Les arthrites réalisées sont aseptiques.

L'inconvénient d'un tel modèle, demeure dans la complexité de sa réalisation et dans le fait que l'on obtient une monoarthrite isolée.

Nous venons de voir l'importance de la composante immunologique dans la genèse de ces polyarthrites expérimentales. Pour comprendre les mécanismes d'action des sérums anti-lymphocytaires (SAL) et des immunosuppresseurs chimiques sur de tels modèles, nous avons étudié ces substances sur les tests immunologiques classiques explorant les réactions d'immunités circulante et cellulaire.

RÉACTION D'IMMUNITÉ CIRCULANTE

Pour étudier l'effet des SAL et des immunosuppresseurs chimiques sur la formation des anticorps circulants, nous avons immunisé des rats avec des érythrocytes de mouton. Cette méthode est reproductible et facile à réaliser. Le taux des anticorps lors de la réponse primaire atteint son maximum à la fin de la deuxième semaine, les immunes globulines mises en cause sont un mélange d'IgM et d'IgG. En effet, chez certains rats, la réaction d'hémagglutination diminue ou s'annule en présence du 2-Mercaptoéthanol.

Au cours de la réponse secondaire, le taux des anticorps, maximum 14 jours après la deuxième stimulation, est nettement plus important (1/640) que celui observé après une première immunisation (1/160). L'augmentation porte essentiellement sur les IgG dont le taux s'élève significativement dès le 7^{ème} jour après la deuxième stimulation. 21 jours après les anticorps formés sont surtout des IgM.

RÉACTIONS D'IMMUNITÉ CELLULAIRE

Les réactions sont de deux types : l'allogreffe cutanée et la réaction tuberculinique.

Ces deux tests sont des réactions d'hypersensibilité retardée qui n'ont pas le même pouvoir sélectif pour tester les substances à visée immunosuppressive.

LE TEST A LA TUBERCULINE est réalisé chez le rat atteint de polyarthrite à adjuvant. L'antigène responsable de la réaction cutanée, est contenu dans l'adjuvant injecté et l'on sait avec PEARSON et COLL. (125-126-167) qu'il est différent de l'antigène arthrogène. Histologiquement, au bout de 24 et 48 heures, la lésion est un infiltrat inflammatoire à cellules mononucléées, principalement des lymphocytes.

La réaction à la tuberculine est positive chez 90 à 100 % des rats ayant reçu l'antigène mycobactérien. Il n'existe pas de corrélation entre l'intensité de la polyarthrite et celle de la réaction tuberculinique.

Au cours de la mesure de l'activité immunosuppressive des substances testées, nous avons mis en évidence soit une corrélation, soit une dissociation entre les effets des drogues sur ces deux réactions chez le même animal. Les discordances apparaissent lorsque les tests cutanés sont faits après l'arrêt du traitement, dans ce cas, l'arthrite est atténuée mais la réaction tuberculinique n'est pas modifiée. Sous traitement, par contre, les deux phénomènes sont diminués.

LES ALLOGREFFES CUTANÉES : pour réaliser les greffes, nous nous sommes inspirés des travaux de MILLINGTON et MOORE (101), mais la mise au point d'une méthode fiable et pratique dans l'exécution de l'interprétation des signes de rejet, a été réalisée grâce aux conseils de MAURER (98). Les rats donneurs sont des «WISTAR» et les receveurs sont des «SPRAGUE-DAWLEY». Notre méthode est appliquée aux greffes de 1^{er} et 2^{ème} «Set». Nous avons vérifié la valeur de notre technique en montrant que le temps de survie des deuxièmes transplantations est significativement plus court que celui observé lors des premières.

Le degré d'histo-incompatibilité entre «WISTAR» et «SPRAGUE-DAWLEY» est inconnu, mais le temps moyen de survie est constant d'une expérience à l'autre.

Nous n'avons pu établir de corrélation stricte entre les effets des substances immunosuppressives sur les allogreffes cutanées et le test à la tuberculine. Après arrêt du traitement immunosuppresseur, la réaction à la tuberculine n'est pas modifiée alors que la survie des allogreffes se maintient.

Cette dissociation entre l'action d'une même drogue immunosuppressive sur ces deux phénomènes d'hypersensibilité retardée, suggère qu'ils ne sont pas de même nature bien qu'ils aient la même signification immunologique. Il est probable que les antigènes de transplantation et celui responsable de la réaction tuberculinique n'ont pas le même pouvoir immunogène et sont à l'origine de réactions inflammatoires différentes dans leur intensité.

On peut penser d'autre part, que dans les deux cas, les lymphocytes sensibilisés manifestent leur activité immunologique par des mécanismes différents : immunoblastes tueurs dans le rejet de la greffe, facteurs phlogogènes (tels que les «MIF» et «MAF») dans le processus inflammatoire que représente la réaction tuberculinique.

LES TESTS ANTI-INFLAMMATOIRES

Pour compléter notre étude des mécanismes d'action des substances immunosuppressives sur les différents modèles de polyarthrite, nous avons étudié ces drogues sur des tests d'inflammation non spécifique chez le rat.

L'OEDEME PLANTAIRE A LA CARRAGÉNINE (WINTER ET COLL. (164)

La réaction inflammatoire réalisée, est limitée à la phase primaire de vasodilatation artériolaire, d'exsudation plasmatique et de diapédèse des polynucléaires et des monocytes sanguins.

Il s'agit d'une technique simple, donnant des résultats constants avec des variations faibles.

C'est le test le plus utilisé pour le screening pharmacologique des substances anti-inflammatoires. L'œdème à la carragénine est peu spécifique : de nombreuses substances anti-rhumatismales stéroïdiennes ou non, diminuent la réaction phlogogène mise en jeu (35-36-164).

Le mécanisme de l'action de la carragénine est complexe (162). Bien que ce polysaccharide sulfaté libère de l'histamine, des kinines et des prostaglandines, les anti-histaminiques et les anti-sérotonines sont inactifs sur ce test (36).

Enfin, nous savons que la carragénine est un inhibiteur de la C1 estérase, première fraction du complément (18-33) dont le rôle pro-inflammatoire est reconnu.

LE TEST DU PELLET D'IVALON. Nous avons amélioré les techniques mises au point par COSTÉ, DELBARRE et BASSET (28) et GRINDLAY et WAUGH (57). Un pellet, implanté sous la peau dorsale du rat et excisé de sa coque conjonctive au bout de 8 jours d'évolution, explore la phase tardive de la réaction inflammatoire et plus particulièrement, la prolifération fibroblastique et histiocyttaire.

Ce test pharmacologique est à notre avis, celui qui donne les résultats les plus fiables. Il s'agit d'une méthode sélective, et les médicaments actifs sont souvent très valables en pathologie humaine.

LE GRANULOME A LA CARRAGÉNINE. Nous avons vu que la carragénine est un agent phlogogène puissant. Injectée sous la peau dorsale du rat, elle induit la production d'un granulome qui, au bout de 6 jours d'évolution, est constitué de cellules histiofibroblastiques, de mucopolysaccharides et surtout, de tissu collagène néo-formé (132).

Ce test est de réalisation facile, mais il a le défaut de donner des résultats avec une variation importante, d'où la nécessité d'utiliser un grand nombre d'animaux. Cet inconvénient est compensé par un pouvoir sélectif important. Il s'agit, en effet, d'un test sur lequel pratiquement seuls les corticoïdes sont actifs. (35).

LES SÉRUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES

Nous avons fabriqué trois types de sérums de lapin anti-cellules lymphoïdes de rats :

- des sérums anti-cellules lymphoïdes entières, obtenus à partir de thymocytes (SAL-T), de cellules ganglionnaires (SAL-G) et de cellules spléniques (SAL-S) ;
- un sérum anti-membranes de thymocytes (SAL-MT) ;
- un sérum anti-nucléoprotéines de thymocytes (SAL-NT).

En nous inspirant des travaux de LEVEY et MEDAWAR (89-90), nous avons immunisé des lapins selon trois protocoles soit deux injections intra-veineuses, soit une injection intra-veineuse suivie d'une intra-péritonéale, soit plusieurs injections par voie intra-dermique, de cellules lymphoïdes en suspension dans l'adjuvant complet de FREUND (DIFCO) pour la première immunisation, suivie d'une intra-péritonéale pour la deuxième.

Les sérums préparés à partir de fractions subcellulaires sont obtenus selon les techniques décrites par LEVEY et MEDAWAR (88) ZOLA et MOSEDALE (169). Nous n'avons pu contrôler la taille des fragments de membranes cellulaires, ni pu apprécier le degré de pureté en nucléoprotéines ainsi qu'une éventuelle contamination des deux fractions.

Les injections immunisantes (88-89-90) sont pratiquées à 15 jours d'intervalle et contiennent chacune $1,5 \times 10^8$ à $2,8 \times 10^9$ cellules vivantes ou 100 mg de membranes ou 200 mg de nucléoprotéines de thymocytes.

Les différents SAL anti-cellules lymphoïdes entières, anti-membranes et anti-nucléoprotéines de thymocytes ainsi que le sérum normal (SN) de lapin, sont testés «in vitro» par leur effet lymphoagglutinant, leur pouvoir mitogénique sur les lymphocytes de rat en culture et leur capacité d'inhiber la migration des thymocytes :

- les cinq sérums anti-lymphocytaires ont un pouvoir lymphoagglutinant similaire vis-à-vis des cellules thymiques, ganglionnaires et spléniques.
- sur le test de transformation lymphoblastique, les trois SAL anti-cellules lymphoïdes entières induisent la transformation lymphoblastique des lymphocytes de rats normaux en culture. Le taux de transformation est comparable à celui obtenu avec la PHA. On ne peut comparer leur activité lymphostimulante car notre méthode de culture de lymphocytes n'est pas quantitative. Leur pouvoir mitogénique est spécifique puisque le sérum normal de lapin ne produit pas de transformation blastique.
- sur le test de migration des thymocytes, le SAL-T, le SAL-MT et le SAL-NT ont le même pouvoir inhibiteur.

Ces résultats montrent que les tests «in vitro» ne permettent pas de sélectionner le SAL le plus actif. Il est étonnant qu'un sérum fabriqué à partir de nucléoprotéines possède la même activité «in vitro» qu'un sérum anti-membranes de thymocytes.

Sans pouvoir expliquer formellement ce phénomène, nous pouvons penser que nos méthodes d'extraction ne sont pas suffisamment fines pour éliminer toute contamination.

LES SAL ET L'IMMUNITÉ CIRCULANTE

Nous avons montré que les SAL-T, SAL-MT et SAL-NT comme le SN n'ont aucune action dépressive sur la réaction primaire de la formation des anticorps anti-hématies de mouton chez le rat.

Nous avons injecté de faibles quantités de SAL, par voie I.P. (3,5 ml en 5 jours à partir du jour de l'immunisation). Ce faible dosage peut expliquer l'inactivité de ce SAL (7).

Bien qu'ils n'aient pas une spécificité absolue, les SAL sont surtout efficaces sur les lymphocytes thymodépendants responsables des réactions d'immunité cellulaire.

L'immunisation par les hématies hétérologues stimule essentiellement le système d'immunité circulante (formation d'IgM et d'IgG). De tels faits seraient en faveur d'une inactivité fondamentale des SAL sur l'immunité humorale. En fait, plusieurs auteurs JAMES (66-67-68) et LIEBERMANN (91) ont montré que le SAL, à fortes doses, possède un effet inhibiteur sur la formation des anticorps circulants quand ils sont administrés avant la stimulation antigénique.

LES SAL ET L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION CUTANÉE

Les SAL-T, SAL-MT et SAL-NT sont essayés sur les allogreffes cutanées de première et deuxième transplantations chez le rat. Les sérums sont injectés soit 3 jours avant (J-3) soit à partir du jour de l'allogreffe (J0) et jusqu'au 9ème jour (J9). Les quantités totales sont toujours peu importantes de 2 à 7 ml.

Les SAL actifs prolongent le temps de survie des greffes de 1ère et de 2ème transplantations, mais ce temps est court :

- sur les greffes de 1er «set» :
13,3 jours pour le SAL-T ($p < 0,01$),
11,1 jours avec le SAL-MT ($p = 0,05$) au lieu de 10,2 jours pour les témoins,
- sur les greffes de 2ème «set» :
9,2 jours avec le SAL-T ($p < 0,01$)
8,6 jours pour le SAL-MT ($p = 0,02$) au lieu de 7,1 jours pour les témoins.

Que ce soit sur le 1er ou le 2ème «set», le SAL-NT et le SN, injectés dans des conditions similaires, n'ont jamais prolongé le temps de survie des allogreffes.

Il apparaît que le SAL-T a la même efficacité que le SAL-MT. Cette absence de différence est probablement liée à la technique trop grossière de préparation des SAL.

Dans cette expérience, les SAL sont administrés par voie I.P. D'après DALTON et COLL. (32) la voie I.V. serait la plus favorable pour prolonger la survie de l'allogreffe cutanée chez le rat.

Contrairement aux tests «in vitro», le temps de survie des allogreffes cutanées permet de sélectionner le meilleur SAL. Dans notre étude, nous n'avons pu mettre en évidence de corrélation entre les résultats «in vitro» et «in vivo». Mais nous devons souligner que les SAL n'ont pas été testés par leur pouvoir d'opsonisation (11 et 56) et d'inhibition de la formation des rosettes (5-6-9-10). Ces techniques seraient les seules donnant des résultats «in vitro» en corrélation avec l'activité immunosuppressive «in vivo».

LES SAL ET L'HYPERSENSIBILITÉ A LA TUBERCULINE

Pour compléter l'étude des SAL sur l'immunité cellulaire, nous avons testé leur activité sur la réaction tuberculinique induite chez les rats atteints de polyarthrite à adjuvant.

Cette réaction est, et reste définitivement positive chez 90 à 100 % des rats arthritiques. Son intensité est sans relation avec celle des manifestations articulaires. Cette dissociation s'explique par la nature différente des antigènes mis en cause (126).

Le test peut être considéré comme un phénomène inflammatoire secondaire à une réaction d'immunité cellulaire. Il peut donc être déprimé par les anti-inflammatoires et les immunosuppresseurs.

Sur la polyarthrite après une première stimulation antigénique, seul le SAL-T diminue l'intensité de cette réaction immunologique, si elle est réalisée sous traitement. Le même résultat est obtenu par CURREY et ZIFF (30-31). Par contre, le SAL-MT n'a pas d'action immunodépressive dans les mêmes conditions.

Sur la polyarthrite après une deuxième injection d'adjuvant, le SAL-T s'est révélé inefficace bien que le test tuberculinique soit pratiqué sous traitement.

Le mode d'action du SAL-T sur ce test d'hypersensibilité retardée n'est pas dû à un effet anti-inflammatoire. Il s'agit très vraisemblablement d'une action immunosuppressive puisque ce SAL prolonge la survie des homogreffes cutanées.

Après une deuxième injection d'adjuvant, nous pouvions supposer obtenir une réaction tuberculinique secondaire plus intense que la réponse primaire. Les résultats n'ont pas confirmé cette hypothèse. Il est probable que la deuxième stimulation antigénique n'a pas provoqué une nouvelle réaction immune. Ce qui explique l'absence d'activité du SAL.

LES SAL ET LA RÉACTION INFLAMMATOIRE

Nous avons essayé le SAL-T, par voie I.P., sur les deux phases de la réaction inflammatoire :

- sur l'OEDEME A LA CARRAGÉNINE, à la dose lymphopénisante (31) de 2 ml par rat, 4 heures avant l'injection phlogogène, ce SAL est inefficace.
- sur la PROLIFÉRATION FIBROBLASTIQUE, la dose de 6 ml de SAL-T par rat en 6 injections, administrée avant et après l'implantation du pellet, montre la même inefficacité.

Les doses de SAL utilisées sur les tests anti-inflammatoires, sont relativement faibles, de l'ordre de celles employées pour leur étude sur les immunités cellulaire et circulante, et sur les polyarthrites.

Pour ARINOVICHE (4), le SAL-T est dénué d'action anti-phlogistique sur la prolifération des cellules mononucléaires (technique de la fenêtre cutanée) et sur la prolifération fibroblastique du granulome (éponge de polyvinyl).

Par contre, MORRIS (102) et TURK (146), avec des doses similaires à celles que nous avons administrées, ont montré que le SAL a une action anti-inflammatoire, uniquement sur la phase initiale de vasodilatation artériolaire. POSSANZA (129) teste des sérums de lapin anti-thymocytes et anti-ganglions de rats sur le test de l'œdème à la carragénine, à raison de 1,5 ml par rat, par voie S/C. Dans ces conditions, identiques aux nôtres, il obtient une inhibition de 73 %, alors que le SN n'a pas d'effet anti-œdémateux.

LES SAL ET LA POLYARTHRITE A ADJUVANT

Les SAL-T, SAL-G, SAL-S et le SAL-MT, ainsi que le SN sont testés sur cette polyarthrite induite par une seule injection de Mycobactérium Tuberculosis au jour JO.

Seuls, le SAL-T et le SN sont essayés sur cette maladie, après une deuxième injection d'adjuvant, 30 jours (J30) après la première.

Dans tous les cas, le traitement est commencé à JO ou à J30. Les sérums sont administrés par voie I.P., 3 ml au total répartis en 5 injections entre JO et J12 pour la polyarthrite après une stimulation et 4 ml au total, répartis en 7 injections entre J30 et J37 pour celle après deux stimulations. Il s'agit de doses relativement faibles, de l'ordre de celles utilisées au cours des études sur les immunités circulante et cellulaire et sur les tests anti-inflammatoires.

- SUR LA POLYARTHRITE APRES UNE STIMULATION ANTIGÉNIQUE : le SAL-T est le plus actif, puis par ordre décroissant : le SAL-MT et le SAL-G. Le SAL-S est pratiquement inefficace.
- SUR LA POLYARTHRITE APRES DEUX STIMULATIONS ANTIGÉNIQUES : le SAL-T n'a pas d'action. Il est intéressant de noter que ce sérum s'est révélé inactif sur la réaction tuberculinique après deux stimulations antigéniques.

Malgré les faibles quantités injectées, tous ces sérums sont toxiques. Le SAL-T a provoqué 5 % de mortalité, le SAL-MT 40 %, les autres sérums 10 %.

Cette dissociation de l'activité du SAL-T sur les polyarthrites après une ou deux injections d'adjuvant pose le problème du mécanisme d'action des SAL.

La polyarthrite à adjuvant est un phénomène inflammatoire, secondaire à une réaction d'hypersensibilité retardée :

- 14 jours après la première injection d'adjuvant, la maladie se manifeste par une réaction phlogogène intense, survenant après un conflit antigène-anticorps. Le SAL est administré de JO à J14, et son effet sur la polyarthrite n'est pas dû, comme nous l'avons vu, à une action anti-inflammatoire mais probablement à son action au stade de l'initiation du conflit immunologique.
- 30 jours après la première, la deuxième inoculation d'antigène, contrairement à ce qu'a écrit PEARSON (115), ne produit pas une recrudescence de la réaction inflammatoire. Cette absence de rebond, permet de supposer qu'il n'y a pas de nouveau conflit immunologique.

Ce qui explique l'inefficacité du SAL injecté pendant une période immunologiquement neutre. Nous confirmons ainsi l'interprétation de CURREY et ZIFF (31) qui relie l'action anti-arthritique du SAL à son action immunosuppressive, et son absence d'effet anti-inflammatoire.

Nous venons de voir que les SAL atténuent l'intensité de la polyarthrite. Sur le plan hématologique, ils corrigent les désordres observés sur cette maladie au 30ème jour d'évolution. L'anémie, l'hyperleucocytose, la polynucléose et la lymphopénie relative sont réduites par les différents SAL, plus fortement par le SAL-T qui est le sérum le plus actif.

Au niveau de la moëlle, les SAL ne modifient pas l'hypercellularité, la polynucléose et la lymphopénie relative. Par contre, ils corrigent l'augmentation du taux des myélocytes et métamyélocytes.

Nos SAL n'ont pas d'effet lymphopéniant, chez les rats arthritiques, quinze jours après la dernière injection de sérum. Par contre, cet effet lymphocytopénique apparaît sous traitement par les globulines anti-lymphocytes (31).

POSSANZA (129) utilise un SAL de lapin anti-thymus et anti-ganglions de rats, à la dose de 10,5 ml en 7 injections, par voie S/C, dont deux avant l'adjuvant et cinq après. Dans ces conditions, il obtient une diminution de 86 % de la polyarthrite. Le sérum qu'il a utilisé a donc sensiblement la même activité que ceux que nous avons fabriqués.

Préparés et administrés différemment, nos SAL ont réduit de 50 % l'intensité de la polyarthrite, alors que CURREY et ZIFF (31) ont obtenu une inhibition de 90 % avec des gamma-globulines anti-lymphocytes, administrées à doses sept fois plus grandes. Par contre, sur le test de lympho-agglutination, nos sérums se sont montrés aussi actifs que ceux testés par ces auteurs (29 - 30 -31). Ces résultats suggèrent que nos sérums ont une activité comparable à ceux utilisés par CURREY et ZIFF (31). Comme ces auteurs, nous pouvons éliminer une action non spécifique des SAL, en effet, le sérum normal de lapin ne réduit pas l'intensité de la polyarthrite par rapport à celle des témoins.

LES SAL ET LA POLYARTHRITE A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS

Sur ce modèle de polyarthrite, le processus phlogogène est secondaire à une bactériémie à P.P.L.O. La maladie guérit spontanément et les animaux guéris sont immunisés vis-à-vis du mycoplasma : une nouvelle injection de l'exsudat arthrogène n'induit pas une nouvelle poussée polyarthritique. Cette immunité protectrice est à la fois cellulaire et humorale. Ainsi, le sérum provenant de rats polyarthritiques, injecté à des animaux ayant reçu le P.P.L.O. pathogène, protège ces derniers passivement (75). D'autre part, les cellules ganglionnaires et spléniques provenant de rats immuns ont la même action protectrice (75).

Le SAL-T à des doses similaires à celles utilisées au cours des tests déjà décrits, a un effet discrètement aggravant sur cette polyarthrite. Par contre, le SN augmente nettement l'intensité de la polyarthrite.

Nous supposons que le SAL-T aggrave l'arthrite à P.P.L.O. en provoquant une dépression des défenses immunitaires vis-à-vis du P.P.L.O. L'effet aggravant du SN ne peut être élucidé car nous n'avons pas testé les réponses immunes vis-à-vis du SN chez les rats atteints de polyarthrite à mycoplasma. Cependant, nous pensons qu'il est possible que des complexes antigène (SN) - anticorps soient attirés au niveau des articulations enflammées et phagocytés par les très nombreux macrophages présents dans ces sites et que la persistance de ces complexes dans ces cellules provoque une réponse inflammatoire supplémentaire.

LES IMMUNOSUPPRESSEURS CHIMIQUES ET L'IMMUNITÉ CIRCULANTE

L'azathioprine, le chlorambucil, le cyclophosphamide (C.P.P.), le méthotrexate (MTX) et le 5-fluorouracile (5-FU) sont testés sur la formation des anticorps anti-hématies de mouton chez le rat après une première stimulation. Seul, le 5-FU n'est pas essayé sur la réponse secondaire. La deuxième stimulation a lieu 14 jours (J 14) après la première (J0).

Dans ces deux cas, les substances sont administrées pendant 6 jours à partir de J0 ou J14 :

- l'azathioprine, per os, à la dose moyenne de 50 mg/kg/j,
- le chlorambucil, par voie orale, à la dose de 17 mg/kg/j,
- le cyclophosphamide, par voie S/C. à la dose de 10 mg/kg/j,
- le méthotrexate, par voie orale, à la dose de 0,2 mg/kg/j,
- le 5-fluorouracile, par voie S/C, à la dose de 12,5 mg/kg par jour.

Dans ces conditions, le 5-FU n'a aucune action sur la formation des anticorps anti-hématies de mouton après une première stimulation. Par contre, les quatre autres anti-mitotiques ont une action dépressive sur l'immunité circulante. Les plus actifs sont le MTX et le CPP, puis l'azathioprine et le chlorambucil.

Sur la formation des anticorps après une deuxième sensibilisation, l'efficacité des anti-mitotiques est nettement moins intense. Le chlorambucil est le plus actif et son action est durable. Par contre, les trois autres anti-mitotiques ont un pouvoir immunodépresseur passager, mais des trois, le CPP est le plus efficace.

Lors de la première stimulation, nous avons montré, par le test au 2-mercaptoéthanol, que les anticorps anti-hématies de mouton sont un mélange d'IgG et d'IgM.

Lors de la deuxième immunisation, les IgG prédominent pendant les deux premières semaines, les IgM apparaissent à un taux plus élevé à partir de la troisième.

Il est bien connu que les IgM sont généralement moins sensibles aux anti-mitotiques que les IgG (136). Nous avons pu vérifier le pouvoir inhibiteur préférentiel de l'azathioprine, du CPP et du chlorambucil sur la formation des IgG.

D'autre part, il est montré que pour un même immunosuppresseur, il faut des doses plus fortes pour inhiber la réponse anamnétique que pour supprimer la réponse primaire (141).

Enfin, l'activité immunosuppressive dépend de la nature des anti-mitotiques utilisés et de leur modalité d'administration.

D'une façon générale, les analogues des purines et les antifoliques, dépriment les anticorps circulants lorsqu'ils sont administrés immédiatement avant ou en même temps que l'antigène car ils agissent en inhibant l'induction de la synthèse des anticorps.

Par contre, les alkylants peuvent être actifs qu'ils soient donnés avant ou après l'antigène, car ils agissent à la fois sur les cellules «précurseurs» qui n'ont pas encore synthétisé des anticorps et sur les cellules immunocompétentes productrices d'anticorps (12 - 49).

En ce qui concerne le 5-FU, SANTOS (138) a montré que cet anti-mitotique à une dose égale à 10 mg/kg/j, par voie I.V., pendant 5 jours (2 jours avant et 3 jours après l'immunisation) n'a pas de pouvoir immunosuppresseur, chez la souris et le rat immunisés par des hématies de mouton.

Dans notre expérience, les anti-mitotiques actifs ont inhibé la réponse primaire parce qu'ils sont administrés à fortes doses à partir du jour de l'injection de l'antigène.

Sur la réponse anamnétique, leur activité est plus faible, mais ils sont donnés à partir du jour de la deuxième injection d'hématies (soit J14). A cette période, persistent les anticorps synthétisés lors de la première immunisation. L'azathioprine et le méthotrexate n'ont pu, en principe, déprimer les anticorps préexistants : ils ont tout au plus diminué la recrudescence d'anticorps secondaires à la deuxième stimulation.

Par contre, les alkylants et en particulier le chlorambucil ont déprimé à la fois, les anticorps de première et de deuxième sensibilisations.

LES IMMUNOSUPPRESSEURS CHIMIQUES SUR L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION

Nous avons étudié : l'azathioprine, le chlorambucil, le cyclophosphamide (CPP), le méthotrexate (MTX) et le 5-fluoro uracile (5-FU) sur les allogreffes cutanées chez le rat, en utilisant la technique déjà décrite.

Seuls les anti-mitotiques capables d'allonger le temps de survie des greffes de première transplantation sont testés sur celles de 2ème «set».

Pour les greffes de 1er «set», les traitements sont commencés à partir de J0 (jour de la transplantation) et au maximum jusqu'à J15.

Pour les greffes de 2ème «set», nous avons étudié l'activité des substances injectées à partir du jour de la deuxième greffe (soit J15 ou J30) et pendant 16 jours au maximum. La posologie quotidienne est variable d'un jour à l'autre et dépend de l'état général et de la variation du poids corporel de chaque rat. Les doses employées, n'entraînent pas de mortalité mais ne peuvent être dépassées. En moyenne : 20mg/kg, per os, pour l'azathioprine ; 8 mg/kg, per os pour le chlorambucil ; 10 mg/kg par voie S/C pour le cyclophosphamide ; 12,5 mg/kg par voie S/C pour le 5-FU et pour le MTX 0,1 mg/kg/j par voie orale.

Trois des anti-mitotiques testés sur les greffes de 1er «set» sont capables d'allonger le temps de survie :

- 18,6 jours pour le chlorambucil ($p < 0,01$),
- 22,4 jours pour le cyclophosphamide ($p < 0,01$),
- 12,3 jours pour le 5-fluoro uracile ($p < 0,01$) au lieu de 10,2 jours pour les témoins.

Sur les greffes de 2ème «set», seuls le chlorambucil et le CPP allongent le temps de survie :

- 16,5 jours pour le chlorambucil ($p < 0,01$)
- 11,3 jours pour le cyclophosphamide ($p < 0,01$) au lieu de 7,1 jours pour les témoins.

Pour mettre en évidence l'induction d'une tolérance, nous avons traité dans les mêmes conditions, des rats par le CPP et le chlorambucil pendant 14 jours à partir du jour de la première transplantation (J0). La deuxième implantation a lieu à J20. Dans ces conditions, le temps de survie de la greffe de 2ème «set» est de 10,2 jours pour le cyclophosphamide et de 15,7 jours ($p=0,05$) pour le chlorambucil au lieu de 8,2 jours pour les témoins.

Ces résultats montrent bien la nette supériorité des agents alkylants, en particulier du chlorambucil qui prolonge les greffes de premier et deuxième «set» et qui est capable d'induire un état transitoire de tolérance.

Dans toutes les expériences, les anti-mitotiques sont administrés à partir du jour de la transplantation. Qu'ils agissent sur l'induction de la réaction immunologique, sur les cellules immunocompétentes ou sur les cellules tueuses de la greffe, toutes ces substances auraient dû, en principe, prolonger le temps de survie des allogreffes cutanées chez le rat.

Si nous n'avons pu obtenir de prolongation des greffes de 1er «set» avec le méthotrexate, à la dose de 0,2 mg/kg par jour, il est vraisemblable qu'une telle posologie est insuffisante pour déprimer cette réaction immunologique. Avec la dose toxique de 15 mg/kg chez le cobaye, BERENBAUM (14) n'obtient pas d'allongement du temps de survie des allogreffes cutanées. La prolongation nécessite la dose de 18 mg/kg. PATKOWSKI (113) a obtenu le même échec avec les doses de 1,0 et 1,5 mg/kg, I.V., de MTX chez le lapin, en donnant le médicament 4 jours avant et 3 jours après la greffe.

Avec l'azathioprine, la dose de 20 mg/kg est inactive mais l'on doit remarquer que NOUZA (108) a utilisé la dose de 150 mg/kg par jour, pendant 10 jours chez la souris pour obtenir une prolongation de la survie de 150 jours. Ceci dans un système d'histo-incompatibilité faible, où les souris non traitées rejettent la greffe au bout de 30 jours.

La faible efficacité du 5-FU, à la dose de 12,5 mg par kg/j., pendant 14 jours, ne doit pas nous étonner, si l'on considère les travaux de PATKOWSKI (113) qui a montré l'absence de propriété immunosuppressive chez cet analogue des pyrimidines, sur les allogreffes cutanées, chez le lapin, aux doses de 2 et 5 mg/kg, I.V., 2 jours avant et 6 jours après la transplantation.

Par contre, nos résultats favorables avec les agents alkylants sont en accord avec ceux de BERENBAUM (13) qui a montré qu'une seule injection de cyclophosphamide chez la souris, donnée deux jours après la transplantation, provoque une survie de 40 jours au lieu de 10 jours chez les témoins, c'est-à-dire dans un système de forte histo-incompatibilité.

Des résultats semblables sont obtenus par SANTOS et OWENS (137) chez le rat.

LES IMMUNOSUPPRESSEURS CHIMIQUES ET LE TEST A LA TUBERCULINE

Les cinq anti-mitotiques sont testés sur la réaction tuberculinique provoquée chez les rats atteints de polyarthrite à adjuvant.

Cette réaction d'hypersensibilité retardée est faite soit 14, 18 ou 22 jours après une première injection d'adjuvant, soit 11 jours après une deuxième.

Les agents cytotoxiques sont administrés jusqu'au 15ème ou 16ème jour après le premier stimulus antigénique et 17 jours après le deuxième.

— Sur la réaction tuberculinique après une stimulation antigénique, l'effet de ces substances est variable avec les modalités d'administration. Lorsque le test cutané est pratiqué sous traitement : l'azathioprine (28 mg/kg), le chlorambucil (12 mg/kg) et le CPP (10 mg/kg) dépriment la réaction.

Lorsque le test tuberculinique est fait 2 jours après la dernière administration du 5-FU (12,5 mg/kg) et du MTX (0,1 mg/kg) les deux anti-mitotiques dépriment cette réaction d'hypersensibilité.

Lorsque le test est réalisé 7 jours après la dernière injection d'azathioprine (28 mg/kg), de chlorambucil (12 mg/kg) ou de cyclophosphamide (10 mg/kg), les trois substances sont inefficaces sur ce test.

— Sur la réaction tuberculinique après une deuxième stimulation, faite sous traitement, le CPP (10 mg/kg) a un effet inhibiteur. Par contre, le chlorambucil à la dose de 6,8 mg/kg est sans action. On doit noter que la réaction tuberculinique, après deux stimulations antigéniques a la même intensité que celle obtenue après la première immunisation. Il est vraisemblable que la deuxième injection d'antigène n'a pas provoqué de nouveau conflit immunologique, et l'action du cyclophosphamide peut s'expliquer par son effet antiphlogistique. Pour le chlorambucil, nous avons vu qu'il faut atteindre la dose de 8 mg/kg pour obtenir un effet anti-inflammatoire.

Nous avons déjà constaté que la réaction à la tuberculine peut, théoriquement, être déprimée par les anti-inflammatoires et les immunosuppresseurs. Nos expériences montrent que le chlorambucil et à un degré moindre le CPP et le MTX possèdent des propriétés antiphlogistiques, contrairement à l'azathioprine et au 5-FU mais que tous inhibent cette réaction d'immunité cellulaire.

KALLIOMÄKI (77) déprime la réaction tuberculinique au 19ème jour chez les rats arthritiques, traités par la 6-MP, homologue de l'azathioprine, à la dose de 15 mg/kg/j., pendant 24 jours, le traitement ayant été commencé 3 jours avant l'injection du mycobactérium.

WARD et COLL. (154) n'obtiennent pas d'inhibition de la réaction faite 14 jours après l'injection antigénique, c'est-à-dire sous traitement par la 6-MP à la dose de 75 mg/kg/j. La même inefficacité est constatée avec le MTX aux doses toxiques de 0,25 et 0,50 mg/kg/j., pendant 14 jours par voie I.M. ou I.P.

Les agents alkylants et en particulier le cyclophosphamide, inhibent la réaction à la tuberculine chez le cobaye (95 et 145). PATKOWSKI (113) a montré que le 5-fluoro uracile n'a pas de pouvoir immunodépresseur chez l'animal.

Nos résultats et ceux de la littérature, indiquent que les immunosuppresseurs doués ou non de propriétés anti-inflammatoires ont tous une action inhibitrice sur la réaction à la tuberculine, à condition qu'ils soient administrés à dose suffisante et que le test soit réalisé sous traitement ou peu de temps après son arrêt.

LES IMMUNOSUPPRESSEURS CHIMIQUES : ACTION ANTI-INFLAMMATOIRE CHEZ LE RAT.

Trois tests anti-inflammatoires classiques sont proposés pour l'étude des anti-mitotiques :

- l'œdème à la carragénine, le pellet d'ivalon et le granulome à la carragénine qui explorent respectivement :
- la phase précoce de la réaction inflammatoire, la prolifération fibroblastique et la synthèse du tissu collagène.

SUR LA PHASE AIGUE, seul le chlorambucil a un effet anti-œdémateux (17), à la dose non toxique mais leucopénisante de 8 mg par kg/j., administrée préventivement pendant 7 jours.

SUR LA PHASE TARDIVE DE PROLIFÉRATION HISTIO-FIBROBLASTIQUE, seuls, sont actifs : le chlorambucil (10 mg/kg/j.) (17), le cyclophosphamide (12 mg/kg/j.) et le méthotrexate (0,2 mg/kg par jour) administrés curativement pendant 7 jours.

SUR LA SYNTHÈSE DU TISSU COLLAGÈNE, seul le chlorambucil donné curativement, à la dose de 8 mg/kg/j. pendant 5 jours, a une action anti-granulomateuse.

En conséquence, on peut classer par ordre décroissant les cinq agents cytotoxiques étudiés, en fonction de leur pouvoir anti-phlogistique : le plus actif est le chlorambucil qui agit sur toutes les phases de la réaction inflammatoire, puis le MTX et le CPP n'inhibant que les phénomènes secondaires, enfin, l'azathioprine (40 mg/kg/j.) et le 5-fluoro uracile (12,5 mg/kg/j.), pendant 7 jours, sont dénués de toute activité.

Cette étude de l'effet anti-phlogistique des substances anti-mitotiques est d'un grand intérêt pour expliquer leur activité sur les réactions d'hypersensibilité retardée. Aussi, la littérature comporte-t-elle plusieurs travaux sur ce sujet. Pour STEVENS et WILLOUGHBY (144) le MTX, le CPP et la 6-MP agissent, à très fortes doses, sur les réactions inflammatoires exsudatives. PAGE (112) étudie, chez le lapin, le 5-FU et le CPP sur l'inflammation produite par l'ovalbumine ; il montre que ces deux substances sont inefficaces sur les phénomènes cellulaires précoces du processus phlogogène. Pour LECHAT et COLL. (87) la 6-MP et l'azathioprine, à doses élevées, diminuent l'œdème provoqué par la carragénine ; le MTX et à un degré moindre l'azathioprine inhibent la prolifération cellulaire dans le granulome à l'amiant. BOLE (16) confirme l'activité inhibitrice de la 6-MP et ARINOVICHE (4) celle de l'azathioprine sur l'infiltration fibroblastique dans le test du pellet de polyvinyl. Des résultats similaires sont obtenus par HURD (63) chez le lapin et par HERSH (60) chez l'homme, avec la 6-MP par la technique de la fenêtre cutanée. Sur ce test appliqué au rat, l'azathioprine supprime l'infiltration des cellules mononucléées (4).

Bien que les tests utilisés soient semblables, il est difficile de comparer nos résultats obtenus avec l'azathioprine à ceux de LECHAT (87) et de ARINOVICHE (4) du fait des différences entre les doses et leur modalité d'administration.

En ce qui concerne le cyclophosphamide, nos résultats concordent avec ceux de PAGE (112) et ARINOVICHE (4).

Comme ces auteurs, nous avons montré que cet alkylant a une action inhibitrice sur la prolifération fibroblastique qui s'oppose à son absence d'effet anti-œdémateux.

Nos résultats confirment ceux de PAGE (112) qui indique l'inefficacité du 5-FU.

Dans notre expérience, le MTX est actif sur le test du pellet d'ivalon alors que STEVENS (144) prouve le contraire sur le test du pellet de coton. Par contre, nous confirmons les travaux de LECHAT (87) démontrant que ce produit n'a pas d'action anti-œdémateuse alors qu'il est efficace sur le test du granulome à l'amiant.

Pour expliquer le mécanisme d'action du pouvoir anti-inflammatoire des anti-mitotiques, STEVENS (144) souligne qu'il existe une corrélation entre l'action pharmacodynamique et l'effet lymphopéniant.

Notre expérience avec le chlorambucil et le cyclophosphamide, à doses leucopénisantes globales, confirme ce mécanisme. HURD et ZIFF (63) évoquent le même processus pour démontrer l'action anti-phlogistique de la 6-MP.

Cependant, cette hypothèse est infirmée par les travaux récents de WILLOUGHBY (163) qui signale qu'une réaction inflammatoire aiguë, non spécifique, peut se dérouler en l'absence de polynucléaires, à condition que le complément soit présent. Cet auteur établit en outre, une relation entre l'effet anti-phlogistique et l'effet anti-complémentaire : le MTX provoque une agranulocytose mais ne modifie pas le taux du complément sérique et il est sans action sur les réactions phlogogènes. A l'opposé, le sérum anti-polynucléaire doué d'activité neutropénisante et anti-complémentaire, a une nette action inhibitrice sur la réaction inflammatoire aiguë.

A l'échelle moléculaire, nous pouvons opposer d'une part l'azathioprine (45) et le 5-FU (48-58) qui exercent leur pouvoir anti-mitotique uniquement en altérant la synthèse des ADN et ARN et des co-enzymes à base de nucléotides. D'autre part, le MTX et les ALKYLANTS dont le mécanisme d'action est complexe. L'anti-folique a un effet anti-métabolique qui s'étend non seulement à la synthèse des acides nucléiques mais encore à celles de plusieurs amino-acides (15). De même, les alkylants par la haute réactivité chimique de leurs centres nucléophiles, sont des substances polyfonctionnelles capables de dépuriner le DNA (21-22-86-133-147-157) et de réagir avec de nombreux ions organiques et inorganiques.

Le mécanisme de la réaction inflammatoire est mal connu. WITHEHOUSE (158 et 159) cependant, émet l'hypothèse que l'activité anti-inflammatoire serait liée à la propriété qu'ont certaines molécules de découpler la phosphorylation oxydative en se fixant sur le groupement acide aminé «lysyl» des sites enzymatiques (161).

Dans le cadre d'une telle hypothèse, il est permis de penser que le MTX, le chlorambucil et le cyclophosphamide qui interviennent à plusieurs niveaux dans le métabolisme cellulaire, puissent avoir une action anti-inflammatoire. La même hypothèse peut s'appliquer à l'azathioprine et au 5-FU, mais il est probable que leurs inefficacités soient liées à l'insuffisance des doses utilisées.

LES IMMUNOSUPPRESSEURS CHIMIQUES ET LA POLYARTHRITE A ADJUVANT

Les cinq anti-mitotiques sont essayés sur cette maladie expérimentale après une injection d'adjuvant à J0, dans la patte postérieure droite.

Le chlorambucil et le cyclophosphamide sont les seules substances testées sur la polyarthrite après une deuxième stimulation à J30. Dans ce cas, les deux injections de mycobactérium tuberculosis sont pratiquées dans la racine de la queue.

L'administration des médicaments commence le jour de la 1ère ou 2ème stimulation antigénique et est poursuivie quotidiennement pendant 15 jours.

SUR LA POLYARTHRITE APRES UNE STIMULATION ANTIGÉNIQUE : l'azathioprine, le chlorambucil et le méthotrexate sont donnés, per os, aux doses respectives, moyennes de 28,12 et 0,1 mg/kg par jour. Le cyclophosphamide et le 5-fluoro uracile, par voie sous-cutanée, aux doses de 10 et 12,5 mg/kg/j.

SUR LA POLYARTHRITE APRES DEUX STIMULATIONS ANTIGÉNIQUES : la dose moyenne de chlorambucil n'est que de 6,8 mg/kg/j., le cyclophosphamide est administré à la dose de 10 mg/kg/j.

Dans ces conditions, **SUR LA POLYARTHRITE APRES UNE STIMULATION :** l'azathioprine et le chlorambucil sont toxiques. Ils ont provoqué respectivement 20 et 27 % de mortalité. Au cours de la troisième semaine, c'est-à-dire 8 jours après l'arrêt du traitement, ils ont diminué l'intensité de la polyarthrite respectivement de 72 et 85 %. Par contre, le cyclophosphamide, le MTX et le 5-FU, à doses non toxiques, ont réduit l'inflammation articulaire de 95, 88 et 78 %.

En tenant compte de la toxicité, nous considérons le CPP, le MTX et le 5-FU, comme les immunosuppresseurs les plus actifs sur ce test. Toutefois, le chlorambucil se révèle supérieur à l'azathioprine.

SUR LA POLYARTHRITE APRES DEUX STIMULATIONS : le chlorambucil et le CPP ont provoqué la mort de 33 et 60 % des animaux, mais il faut noter qu'il s'agit de rats très malades du fait de la toxicité de l'adjuvant. Sur le plan de l'efficacité, 8 jours après l'arrêt du traitement, le chlorambucil a diminué l'indice de la polyarthrite de 44 % et le cyclophosphamide de 61 %. Il est probable que la réinoculation de l'antigène n'a pas provoqué un nouveau conflit immunologique et ces résultats confirment l'action anti-inflammatoire des alkylants.

La maladie à adjuvant étant considérée comme une maladie immunitaire, de nombreux auteurs ont testé sur ce modèle plusieurs anti-mitotiques.

Il est important de distinguer l'action «immunosuppressive» (c'est-à-dire lorsqu'une substance empêche l'apparition de la polyarthrite) de l'action «immunodépressive» (c'est-à-dire lorsque l'anti-mitotique diminue la sévérité de l'atteinte articulaire). D'une façon générale, l'effet immunosuppresseur est obtenu pour des doses toxiques. Par contre, l'effet dépresseur est observé pour des doses relativement faibles, bien tolérées.

Notre étude de l'azathioprine montre qu'il s'agit d'un anti-mitotique dénué de pouvoir immunosuppresseur puisqu'à dose toxique, il ne prévient pas l'apparition de la maladie. Par ailleurs, son effet atténuant est relativement faible.

Des résultats comparables sont obtenus par WARD (154) avec la 6-MP, dont les doses immunosuppressives sont mortelles alors que les doses anti-arthritiques ne le sont pas. KALLIOMÄKI (77) confirme l'effet immunodépresseur de la 6-MP à faible dose.

En ce qui concerne le chlorambucil, nos travaux soulignent sa supériorité sur l'azathioprine comme agent anti-arthritique mais signalent l'absence de son effet immunosuppresseur, même à dose toxique.

Pour le cyclophosphamide, nous avons employé une dose n'ayant jamais entraîné de mortalité dans la polyarthrite après une stimulation antigénique. Dans ces conditions, nous avons obtenu l'effet immunodépresseur le plus important. Mais l'incidence de l'arthrite n'a pas été modifiée. Nous confirmons les résultats de GLEEN (53 et 54) qui compare le CPP à la cytarabine et celle de BROWN (24) qui montre l'effet préventif de cet alkylant.

Dans notre étude, le MTX à la dose de 0,1 mg/kg/j., per os, n'est pas immunosuppresseur, mais diminue fortement l'intensité de la polyarthrite. Nous confirmons ainsi les résultats de WARD (154) qui obtient avec la même posologie, par voie I.P., des conclusions semblables aux nôtres. Mais il a dû utiliser des doses mortelles pour supprimer l'apparition de la maladie.

Le 5-FU se révèle dans notre travail un immunodépresseur très actif, à la dose de 12,5 mg/kg, par voie S/C. Dans les mêmes conditions GLEEN (53) n'a pas obtenu d'effet immunosuppresseur.

Nous venons de voir que les cinq anti-mitotiques étudiés se sont comportés non comme des médicaments inhibiteurs mais seulement comme des substances atténuant l'intensité de la maladie.

D'autre part, l'étude de la pathogénie de la polyarthrite met en évidence les deux composantes immunologique et inflammatoire. Ces deux constatations posent le problème du mécanisme d'action anti-arthritique des anti-mitotiques. Pour l'étudier, nous analyserons successivement les relations entre l'effet atténuant sur la polyarthrite, les actions dépressives sur les réactions d'immunité humorale, de transplantation, à la tuberculine, enfin, l'effet anti-inflammatoire sur l'œdème, le pellet et le granulome.

Ces résultats figurent dans le tableau n° 76, ci-après.

Ce tableau montre que l'efficacité des médicaments sur un seul paramètre ne peut expliquer leur action bénéfique sur la polyarthrite à adjuvant.

Cependant, il est possible d'établir certains faits :

- 1 — tous les anti-mitotiques dépriment la réaction tuberculinique et tous sont actifs sur la polyarthrite. L'existence d'une relation entre l'efficacité sur le test cutané et l'effet anti-arthritique ne doit pas nous étonner puisque l'adjuvant injecté contient simultanément «l'antigène» responsable de l'arthrite et «celui» responsable de la réaction de l'hypersensibilité à la tuberculine ;
- 2 — les produits, tels le cyclophosphamide, le chlorambucil et à un degré moindre, le 5-fluorouracile, qui allongent le temps de survie des allogreffes cutanées ont un effet anti-arthritique puissant ;
- 3 — les substances comme le chlorambucil, le cyclophosphamide et le méthotrexate, qui sont doués de propriétés anti-inflammatoires, atténuent fortement la maladie à adjuvant.

TABLEAU N° 76
MÉCANISME D'ACTION DE L'EFFET ANTI-ARTHRITIQUE SUR LA POLYARTHRITE A ADJUVANT

PRODUITS		AZATHIOPRINE	CHLORAMBUCIL	CYCLO- PHOSPHAMIDE	5-FLUORO URACILE	METHOTREXATE
IMMUNITÉ CIRCULANTE	DOSE en mg/kg/j. % V/T	50 x 6 - 3	17 x 6 - 3	10 x 6 - 5	12,5 x 6 + 2	0,2 x 6 - 4
RÉACTION TUBERCULINE	DOSE en mg/kg/j. % V/T	28 x 13 - 70	8 x 13 - 64	10 x 13 - 94	12,5 x 14 - 44	0,1 x 14 - 44
ALLOGREFFE CUTANÉE	DOSE en mg/kg/j. % V/T	20 x 12 + 15	8 x 15 + 82	10 x 16 + 119	12,5 x 12 + 20	0,1 x 9 - 1
OEDEME	DOSE en mg/kg/j. % V/T	40 x 7 + 13	8 x 7 - 34	10 x 7 - 11	12,5 x 7 - 10	0,2 x 7 - 2
PELLET	DOSE en mg/kg/j. % V/T	40 x 7 - 8	10 x 7 - 48	12 x 7 - 27	12,5 x 7 - 3	0,2 x 7 - 24
GRANULOME	DOSE en mg/kg/j. % V/T	40 x 5 - 6	9 x 4 - 32	10 x 5 - 8		0,2 x 5 - 15
POLYARTHRITE	DOSE en mg/kg/j. % V/T	28 x 13 - 72	12 x 13 - 85	10 x 13 - 95	12,5 x 14 - 78	0,1 x 14 - 88

Nous devons souligner que :

- le cyclophosphamide qui est l'immunosuppresseur le plus actif sur les anticorps circulants, l'un des deux agents les plus efficaces sur l'immunité de transplantation et qui est doué de propriété anti-inflammatoire modérée, est l'agent anti-arthritique le plus actif à dose non toxique ;
- le chlorambucil, actif sur l'immunité circulante, agent anti-inflammatoire le plus puissant, équivalent au cyclophosphamide sur l'immunité de transplantation, a un effet anti-arthritique intense mais à dose toxique ;
- le méthotrexate, très actif sur l'immunité circulante, possédant un pouvoir anti-inflammatoire modéré mais inefficace sur l'immunité de greffe, est un agent anti-arthritique puissant ;
- le 5-fluoro uracile, non anti-inflammatoire, inactif sur l'immunité circulante et ne présentant qu'une faible efficacité sur l'immunité de transplantation, diminue fortement l'intensité de la polyarthrite ;
- l'azathioprine, possédant uniquement une action sur l'immunité circulante est l'agent anti-arthritique le moins actif.

Ces constatations nous permettent d'affirmer :

- qu'un anti-mitotique peut diminuer la polyarthrite à adjuvant uniquement par son action dépressive sur l'immunité cellulaire ;
- que l'efficacité d'un anti-mitotique sur l'immunité circulante joue vraisemblablement un rôle dans l'effet anti-arthritique ;
- que l'action anti-inflammatoire d'un anti-mitotique est suffisante mais non nécessaire à l'effet anti-arthritique. Mais que, l'association des effets anti-phlogistique et immunodépresseur donnent les meilleurs résultats.

EFFET DES IMMUNOSUPPRESSEURS SUR LES MANIFESTATIONS HÉMATOLOGIQUES

A J 16

D'une manière générale, les quatre immunosuppresseurs les plus actifs ont corrigé les désordres hématologiques sanguins et médullaires provoqués par la maladie à adjuvant.

L'azathioprine n'a pas d'effet cytotoxique sur le sang et la moëlle.

Dans LE SANG PÉRIPHÉRIQUE : le chlorambucil, le CPP, le 5-FU et le MTX ont normalisé l'hyperleucocytose mais les alkylants ont provoqué une lymphopénie sans neutropénie. Contrairement à l'anti-folique et à l'analogue des pyrimidines qui eux, ont corrigé complètement la polynucléose neutrophile.

DANS LA MOELLE : les cinq immunosuppresseurs ont diminué l'hypercellularité provoquée par la polyarthrite. Cependant, le chlorambucil, et le MTX ont un effet cytotoxique bien qu'ils n'aient pas modifié le taux des cellules souches par rapport à celui précédant l'injection d'adjuvant. Sur la série myélocytaire, seul le cyclophosphamide a diminué le taux des myéloblastes et promyélocytes. Les autres anti-mitotiques ont corrigé l'hypermyélocytose induite par la maladie. Seuls, les alkylants n'ont pas corrigé la polynucléose et ont aggravé la lymphopénie relative. Sur la série érythroblastique, le CPP et le MTX ont un effet cytotoxique.

EN RÉSUMÉ : nous retenons l'effet lymphopéniant central et périphérique des alkylants, l'effet cytotoxique du chlorambucil, du CPP et du MTX. La létalité provoquée par l'azathioprine n'est pas liée à l'effet cytotoxique, contrairement à celle induite par le chlorambucil.

LES IMMUNOSUPPRESSEURS CHIMIQUES ET LA POLYARTHRITE A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS.

Sur cette polyarthrite infectieuse, seuls sont testés l'azathioprine et le chlorambucil, per os, le cyclophosphamide par voie sous-cutanée, aux doses respectives de 40,10 et 10 mg/kg/j., pendant 6 jours à partir du jour de l'injection de l'exsudat arthrogène.

Dans ces conditions, l'azathioprine qui provoque la mort de deux animaux sur cinq, diminue l'intensité de la polyarthrite de 50 % mais cette modification n'est pas significative. Par contre, le chlorambucil et le cyclophosphamide qui tue un rat sur 5, augmentent l'indice d'arthrite respectivement de 87 à 73 %.

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux sur l'étude des immunosuppresseurs sur ce modèle qui est utilisé uniquement pour tester les anti-inflammatoires (38 et 69), les anti-paludéens de synthèse (38) et les sels d'or (38-69-70). Il faut rappeler que les tétracyclines, bactériostatiques pour le P.P.L.O., inhibent la polyarthrite (35 et 70).

Nous avons réalisé cette expérience pour mettre en évidence les conséquences d'un traitement immunosuppresseur dans une maladie infectieuse.

Il est bien connu qu'un traitement immunosuppresseur comporte le risque d'une aggravation d'une infection existante. Il est probable, que les deux alkylants et l'azathioprine augmentent la bactériémie à P.P.L.O.

En conséquence, nous supposons que l'effet aggravant du chlorambucil et du cyclophosphamide sur cette polyarthrite à mycoplasma arthritidis, est directement en relation avec la dépression des défenses immunes vis-à-vis du P.P.L.O.

L'azathioprine provoque probablement une plus grande dépression immune et une altération de l'état général des rats qui meurent ou deviennent incapables de développer une réaction inflammatoire.

LE CYCLOPHOSPHAMIDE ET LA MONOARTHRITE DU LAPIN

Nous avons utilisé l'une des techniques décrites par GLYNN et COLL. (41 et 127). Sur ce modèle, qui permet de réaliser une arthrite inflammatoire auto-entretenu, les signes histologiques sont identiques à ceux constatés dans la maladie rhumatoïde.

Pour réaliser la meilleure approche des modalités d'un traitement immunosuppresseur chez l'homme, il nous a paru intéressant d'étudier les effets du cyclophosphamide administré par voie générale, avant et après le déclenchement de l'arthrite chez les lapins préalablement immunisés par un exsudat inflammatoire homologue.

L'anti-mitotique est administré par voie I.M. et I.V., à des doses totales de 440 à 600 mg/kg, réparties sur un mois, avant l'injection intra-articulaire d'exsudat arthrogène ; et à des doses de 80 à 140 mg/kg pendant la semaine qui suit l'injection déclenchante. De telles doses ont provoqué une perte moyenne de poids de 34 % et une pancytopénie avec diminution de l'hématocrite (36 %), des plaquettes (49 %) des polynucléaires (48 %) et des lymphocytes (66 %).

Dans ces conditions, le cyclophosphamide n'a pas empêché l'apparition de l'arthrite et n'a pas modifié son évolution qui, au bout de 15 jours, est similaire à celle des lapins non traités (128).

Dans notre expérience, l'inefficacité du CPP soulève plusieurs réflexions :

- 1 — une réaction inflammatoire localisée peut se produire malgré une leucopénie, et notre étude confirme les constatations de WILLOUGHBY (163) avec un sérum anti-polynucléaire et le MTX ;
- 2 — le CPP n'a pas agi comme un anti-inflammatoire. En effet, il est inefficace sur la synovite aiguë non spécifique provoquée par l'huile de croton. Ce résultat est en accord avec l'inactivité de cet anti-mitotique sur l'inflammation aiguë (œdème à la carragénine) qui s'oppose à son efficacité sur la prolifération fibroblastique (le pellet d'ivalon).

- 3 — lorsque le traitement immunosuppresseur commence 11 semaines après la deuxième immunisation, les anticorps «anti-protéines inflammatoires» sont présents dans l'organisme des lapins. Et l'on sait que dans l'immunité retardée, le cyclophosphamide n'agit que sur les lymphocytes en contact avec l'antigène et non sur une réaction immune en pleine évolution (145).

Aussi, 29 jours après le début du traitement immunosuppresseur l'injection déclenchante produit une réaction phlogogène secondaire au conflit antigène-anticorps initial qui ne peut donc être supprimée.

- 4 — Les injections de cyclophosphamide après la stimulation déclenchante, ne seraient utiles que si l'anti-mitotique avait une action anti-inflammatoire sur la phase aigüe, ce qui n'est pas le cas, comme nous l'avons vu.

En conclusion, l'inefficacité du cyclophosphamide provient du fait que cet anti-mitotique n'a pas été administré au moment de la première immunisation des lapins, c'est-à-dire pendant la période d'initiation de la réaction immunologique.

TOXICITÉ DES IMMUNOSUPPRESSEURS

Cette étude est réalisée sur des rats «WISTAR» soumis aux tests anti-inflammatoires non spécifiques. Elle porte sur l'azathioprine, le chlorambucil et le cyclophosphamide.

Les toxicités ainsi obtenues, ne peuvent être comparées à celles observées au cours de la maladie à adjuvant. Dans celle-ci les rats utilisés sont des «SPRAGUE DAWLEY», plus âgés et traités par un adjuvant, toxique à forte dose, qui provoque une polyarthrite et une stimulation médullaire. Il en est de même pour les études sur les différentes immunités au cours desquelles des «SPRAGUE DAWLEY» adultes sont employés.

On ne peut pas comparer les taux de mortalité observés sur les tests de l'œdème à la carragénine et du Pellet d'Ivalon. Sur le test du pellet, les animaux sont sacrifiés le lendemain de l'arrêt du traitement ; aussi, seules les mortalités précoces sont retenues. Le test de l'œdème, au cours duquel les animaux peuvent être observés plusieurs semaines après la suspension des immunosuppresseurs, nous révèle l'importance des mortalités tardives.

L'azathioprine, per os, à la dose de 40 mg par kg/j., pendant 7 jours, n'a aucune action cytotoxique sur le sang et la moëlle. Sur le plan de l'état général, les rats ainsi traités, ont une croissance pondérale inférieure de 70 % à celle des rats témoins, mais n'ont pas maigri. Par contre, la dose de 50 mg/kg par jour pendant 6 jours, provoque 40 % de mortalité précoce.

Le cyclophosphamide, par voie S/C, aux doses de 10 à 12 mg/kg/j., pendant 7 jours, a provoqué respectivement 30 % de mortalité tardive et 10 % de mortalité précoce.

Une telle posologie induit une leucopénie globale et dans la moëlle : une hypocellularité, une lymphopénie très importante et une discrète monocytopenie.

Sur le plan général, la croissance pondérale des rats traités est inférieure de 50 % à celle des témoins, mais il faut noter l'absence d'amaigrissement.

Le chlorambucil, per os, pendant 7 jours, ne provoque aucune mortalité précoce ou tardive jusqu'à la dose de 8 mg/kg/j.

La posologie moyenne de 8,33 mg/kg/j. ne provoque aucune mortalité précoce.

Sur le plan de la cytotoxicité : 2 mg/kg/j. n'induit qu'une lymphopénie périphérique ;
 4 mg/kg/j. provoque dans le sang, une lymphopénie marquée et une neutropénie discrète. On retrouve la lymphopénie dans la moëlle ;
 avec 8 mg/kg/j. on note une leucopénie globale périphérique et des signes importants de cytotoxicité médullaire : hypocellularité, lymphopénie et érythroblastopénie intenses.

Mais ces signes sont réversibles puisque le taux des cellules souches n'est pas modifié.

A partir de la dose de 8,33 mg/kg/j. le chlorambucil provoque une aplasie médullaire irréversible.

Sur l'état général, les doses de 2 et 4 mg/kg/j. entraînent une diminution de la croissance pondérale de 90 % par rapport à celle des témoins. A la dose de 8 mg/kg/j., la croissance pondérale physiologique est supprimée, les animaux maigrissent de 20 à 40 % par rapport à leur poids initial.

EN CONCLUSION :

Ces études sur la toxicité nous permettent de préciser les points suivants :

- 1 – SUR L'IMMUNITÉ CIRCULANTE (rats SPRAGUE DAWLEY) l'azathioprine et le chlorambucil, sont essayés à doses mortelles, le cyclophosphamide et le méthotrexate à doses cytotoxiques, le 5-fluoro uracile à dose bien tolérée sur les états général et cellulaire.
- 2 – SUR LA TRANSPLANTATION CUTANÉE (rats SPRAGUE DAWLEY) les immunosuppresseurs sont testés à doses non mortelles. Seuls, le chlorambucil et le cyclophosphamide sont employés à doses cytotoxiques.
- 3 – SUR LES TESTS ANTI-INFLAMMATOIRES (rats WISTAR), l'action anti-œdémateuse est recherchée pour tous les produits à doses non mortelles sauf pour le CPP, mais à des doses cytotoxiques pour le chlorambucil, le CPP et le MTX.

L'effet sur la prolifération fibroblastique est testé à dose mortelle pour le chlorambucil et le CPP, à dose cytotoxique pour les deux alkylants et le MTX.

L'effet sur le granulome est recherché à doses non mortelles pour les cinq anti-mitotiques, mais à doses cytotoxiques pour les alkylants et le méthotrexate.
- 4 – SUR LA POLYARTHRITE A ADJUVANT ET LE TEST A LA TUBERCULINE (rats SPRAGUE DAWLEY), seuls l'azathioprine et le chlorambucil sont utilisés à doses mortelles et l'effet cytotoxique est constaté avec le chlorambucil, le cyclophosphamide et le méthotrexate.

—

5 - RESUME ET CONCLUSIONS

R É S U M É

Le but de cette étude est de rechercher le mécanisme d'action et les conséquences d'un traitement immunosuppresseur sur certaines réactions inflammatoires secondaires à un conflit immunologique.

A la suite d'un stimulus antigénique, les lymphocytes thymodépendants se transforment en immunoblastes qui secrètent en particulier des facteurs solubles phlogogènes. Au niveau du tissu articulaire, la réaction inflammatoire se traduit par une synovite puis par une arthrite.

Nous présentons dans notre travail, trois modèles d'arthrites expérimentales choisies pour leurs analogies avec certains rhumatismes inflammatoires. D'une part deux affections immunologiques : la polyarthrite du rat à adjuvant et la monoarthrite du lapin induite par un exsudat inflammatoire homologue, d'autre part une maladie infectieuse : la polyarthrite du rat à mycoplasma arthritidis dont le germe responsable est immunogène. Le traitement de ces processus pathologiques sont de deux types, les anti-inflammatoires qui traitent le symptôme et les antibiotiques ou les immunosuppresseurs qui traitent la cause.

Nous avons étudié différents sérums anti-lymphocytaires (SAL) qui en principe, agissent sélectivement sur les lymphocytes thymodépendants et cinq substances anti-mitotiques qui sont électivement actives sur les cellules en division ou en grande activité métabolique comme peuvent l'être celles sensibilisées par un antigène.

LA POLYARTHRITE A ADJUVANT provoquée par l'injection d'une mosaïque d'antigènes de mycobactérium tuberculosis, apparaît dans le cadre d'une maladie systémique chez le rat.

Sur le plan pathogénique, le facteur déclenchant est une réaction d'hypersensibilité retardée : la tuberculoprotéine provoque la transformation blastique des lymphocytes des rats immunisés. Le rôle de l'immunité circulante est probable mais n'a pu être prouvé formellement.

LA POLYARTHRITE A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS provoquée par un exsudat arthrogène riche en «péri pneumonia like organisms» (P.P.L.O.), apparaît dans le cadre d'une bactériémie. D'autre part, le mycoplasme provoque la transformation lymphoblastique des lymphocytes de rats polyarthritiques, et le sérum de tels rats, après irradiation aux U.V., protège de la maladie d'autres rats inoculés avec l'exsudat arthrogène. Ces deux faits suggèrent le rôle stimulant du P.P.L.O. sur les deux aspects de l'immunité.

LA MONOARTHRITE DU GENOU DU LAPIN provoquée par l'injection intra-articulaire d'un exsudat homologue, ayant servi à l'immunisation de l'animal, réalise une synovite auto-entretenu, évoluant pendant toute la vie du lapin.

Pour comprendre le mécanisme d'action des SAL et des immunosuppresseurs chimiques sur ces modèles expérimentaux, nous les avons testés préalablement sur les différents aspects de l'immunité et sur trois types de réactions phlogogènes chez le rat.

L'IMMUNITÉ CIRCULANTE est étudiée par les réponses primaire et secondaire à des injections d'hématies de mouton chez le rat.

L'IMMUNITÉ CELLULAIRE est testée sur les allogreffes cutanées, chez le rat, après une et deux transplantations.

Les modèles de RÉACTIONS INFLAMMATOIRES NON SPÉCIFIQUES, utilisés chez le rat, sont les tests du pellet de polyvinyl, de l'œdème plantaire et du granulome induits par la carragénine qui explorent respectivement la prolifération fibroblastique, la phase exsudative et la synthèse de tissu collagène.

Cinq SAL de lapin anti-rat sont préparés, trois à partir de cellules lymphoïdes entières thymiques, spléniques et ganglionnaires et deux à partir de fractions subcellulaires de thymocytes provenant l'un des membranes, l'autre des nucléoprotéines.

Ces différents SAL testés «in vitro» par leur pouvoir lymphoagglutinant, lymphostimulant et inhibiteur de la migration des thymocytes, présentent une activité similaire.

SUR L'IMMUNITÉ CIRCULANTE, les trois sérums provenant de cellules entières ou de la fraction anti-membranes de thymocytes n'ont aucune action.

SUR L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION, le SAL anti-nucléoprotéines est inactif. Par contre, les temps de survie des greffes de 1ère et 2ème transplantations traitées par les SAL anti-thymocytes et anti-membranes sont similaires dans leur prolongation.

Le SAL anti-thymocytes, à doses fortement lymphopéniantes, n'a pas d'action sur l'OEDEME, ni sur la PROLIFÉRATION FIBROBLASTIQUE.

Les cinq anti-mitotiques étudiés sont : l'azathioprine, le 5-fluoro uracile, le méthotrexate, le chlorambucil et le cyclophosphamide.

SUR L'IMMUNITÉ CIRCULANTE, toutes les substances à l'exception du 5-FU, dépriment la formation des anticorps. Sur la réponse primaire, les plus actifs sont le cyclophosphamide et le MTX, puis l'azathioprine et enfin le chlorambucil. Sur la réponse secondaire, l'efficacité des quatre immunosuppresseurs est moins importante, et le classement de leur activité respective est l'inverse de celui observé sur la réponse primaire.

SUR L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION, seuls les alkylants et le 5-FU prolongent le temps de survie des allogreffes cutanées. Les activités du chlorambucil et surtout du cyclophosphamide sont nettement supérieures à celle de l'analogue des pyrimidines sur la transplantation de 1er « set ».

Sur les greffes de 2ème « set », le chlorambucil est plus actif que le cyclophosphamide et induit même, un état de tolérance immunologique transitoire mais non négligeable.

CERTAINS ANTI-MITOTIQUES SONT DOUÉS DE PROPRIÉTÉS ANTI-INFLAMMATOIRES. Le chlorambucil possède un effet inhibiteur sur l'œdème, la prolifération fibroblastique et la synthèse de tissu collagène. Le cyclophosphamide et le MTX, sont uniquement actifs sur le test du pellet de polyvinyl. Par contre, l'azathioprine et le 5-FU sont dénués de propriétés anti-phlogistiques.

SUR LA POLYARTHRITE A ADJUVANT : les SAL et les anti-mitotiques administrés à partir du jour de l'injection de l'antigène, ne modifient pas la fréquence d'apparition de l'arthrite mais possèdent uniquement un pouvoir atténuant. Ils agissent donc comme des immunodépresseurs et non comme des immunosuppresseurs.

Sur la maladie induite par une première injection d'adjuvant, l'activité de ces substances se classe en fonction du pourcentage d'inhibition de l'indice : le cyclophosphamide (95 %), le MTX (88 %), le chlorambucil (85 %), le 5-FU (78 %), l'azathioprine (72 %), le SAL anti-thymocytes (66 %), le SAL anti-membranes de thymocytes (55 %) et le SAL anti-cellules ganglionnaires (45 %). Le SAL anti-cellules spléniques et le sérum normal de lapin sont inactifs.

L'azathioprine et le chlorambucil provoquent la mort de 20 et 27 % des rats, le SAL anti-thymocytes en tue 5 %, le SAL anti-membranes de thymocytes 40 %, les autres sérums 10 %.

Une deuxième injection d'adjuvant, 30 jours après la première, ne provoque pas de rebond de la polyarthrite mais aggrave l'état général des animaux. Dans cette expérience, le SAL anti-thymocytes ne modifie pas l'intensité des manifestations articulaires contrairement au cyclophosphamide et au chlorambucil qui ont un effet inhibiteur respectif de 61 et 44 %. Bien que les doses soient inférieures ou égales à celles utilisées au cours de la polyarthrite de 1er « set », l'activité des alkylants s'accompagne d'une forte létalité : 33 % pour le chlorambucil, 60 % pour le cyclophosphamide.

Sur les réactions tuberculiques, positives chez les rats polyarthritiques, les SAL et les immunosuppresseurs chimiques ont une activité inhibitrice lorsque la réaction est faite sous traitement ou peu de jours après son arrêt.

LE MÉCANISME D'ACTION ANTI-ARTHRITIQUE est complexe et nous constatons les trois faits suivants :

- 1 — l'effet dépresseur sur l'immunité de transplantation est suffisant mais non obligatoire. En effet, les SAL, les alkylants et le 5-FU qui possèdent cette propriété, atténuent tous la polyarthrite ;

- 2 — l'effet dépresseur sur l'immunité circulante joue un rôle. En effet, l'azathioprine et le MTX incapables d'allonger le temps de survie des greffes mais inhibant la formation des anticorps, diminuent les manifestations articulaires ;
- 3 — l'effet anti-inflammatoire suffisant en lui-même, potentialise l'action immunodépressive : les alkylants et le MTX qui possèdent les deux propriétés, sont parmi les plus actifs sur la polyarthrite.

SUR LA POLYARTHRITE A MYCOPLASMA ARTHRITIDIS : les alkylants qui dépriment les deux types d'immunité, aggravent nettement cette maladie infectieuse. Le SAL anti-thymocytes qui n'affecte que l'hypersensibilité retardée, et l'azathioprine qui est inactive sur l'immunité de transplantation et qui déprime l'immunité humorale, aggravent peu ou pas la polyarthrite.

SUR LA MONOARTHRITE DU LAPIN : le cyclophosphamide, administré 11 semaines après la stimulation antigénique, ne modifie ni l'apparition, ni l'évolution de l'arthrite. Cette inefficacité est liée au mécanisme d'action des alkylants sur l'immunité cellulaire : ils agissent en effet, sur les «lymphocytes» en contact avec l'antigène et non sur une réaction immune en pleine évolution.

LE RAPPORT ENTRE ACTIVITÉ THÉRAPEUTIQUE ET CYTOTOXICITÉ SANGUINE ET MÉDULAIRE est discuté pour les immunosuppresseurs chimiques. Seuls, l'azathioprine et le 5-FU n'ont pas d'effet cytotoxique. Les meilleurs coefficients thérapeutiques anti-arthritiques sont obtenus avec le MTX, le 5-FU et le cyclophosphamide. Néanmoins, le chlorambucil demeure un produit actif dont l'utilisation reste délicate.

~

6 - BIBLIOGRAPHIE

- 1 — AGNEW H.D. The Effect of heterologous anti-lymphocytic serum on the small lymphocyte population of rats. J. Exp. Med. 1968 **128** 111 — 119.
- 2 — AMOR B., KAHAN A., DELBARRE F. La Polyarthrite du rat à mycoplasma arthritidis. III. Caractéristiques ; rôle des « *péri pneumonia like organisms* ». C.R. Soc. Biol. (PARIS) 1964 **158** 1244 — 1246.
- 3 — AMOR B., COSTE F., DELBARRE F. Mise en évidence par culture, d'agents du genre Bedsonia dans le liquide articulaire en cas de rhumatisme de Fiessinger-Leroy-Reiter (F.L.R.). C.R. Acad. Sc. (Paris) 1967 **264** 1365 — 1367.
- 4 — ARINOVICHE R., LOEWI G. Effects of two cytotoxic drugs and of antilymphocytic serum on immune and non immune inflammation in experimental animals. Ann. Rheum. Dis. 1970 **29** 32 — 39.
- 5 — BACH J.F., ANTOINE B. In vitro detection of immuno-suppressive activity of anti-lymphocyte sera. Nature 1968 **217** 658 — 659.
- 6 — BACH J.F., DORMONT J., DARDENNE M., BALNER H. In vitro rosette inhibition by antihuman antilymphocyte serum correlation with skin graft prolongation in subhuman primates. Transplantation 1969 **8** 265 — 280.
- 7 — BACH J.F. Les sérums antilymphocytes I. Rev. Europ. Etud. Clin. Biol. 1970 **15** 28 — 55.
- 8 — BACH J.F. Les Sérums antilymphocytes II. Rev. Europ. Etud. Clin. Biol. 1970 **15** 258 — 278.
- 9 — BACH J.F., DORMONT J. Further developments of the rosette inhibition test for the testing of anti-human lymphocyte serum. Transplantation 1970 **11** 97 — 100.
- 10 — BACH J.F., BALNER H., DARDENNE M., HORS J.H., JOSSO F., DORMONT J. Peut-on mesurer « in vitro » l'efficacité et la toxicité d'un sérum anti-lymphocytes ? — Presse Med. 1970 **78** 535 — 540.
- 11 — BACH M.K., BRASHLER J.R., PERPER R.J. Lymphocytophilic antibody titer as a correlative assay for the immunosuppressive activity of antilymphocytic serum. Transplantation 1970 **9** 49 — 58.
- 12 — BERENBAUM M.C. The Effect of cytotoxic agents on the production of antibody to T.A.B. vaccine in the mouse. Biochem. Pharmacol. 1962 **11** 29 — 44.
- 13 — BERENBAUM M.C., BROWN I.N. Prolongation of homograft survival in mice with single doses of cyclophosphamide. — Nature 1963 **200** 84.
- 14 — BERENBAUM M.C. BROWN I.N. The Effect of delayed administration of folic acid on immunological inhibition by methotrexate. Immunology 1965 **8** 251 — 259.
- 15 — BERTINO J.R., HILLCOAT B.L., JOHNS D.G. Symposium on Immunosuppressive Drugs. Folate antagonists : some biochemical and pharmacological considerations. Fed. Proc. 1967 **26** 893 — 897.
- 16 — BOLE G.G., HEATH L.E. The Effect of 6-mercaptopurine on the inflammatory response stimulated by subcutaneous implantation of polyvinyl sponge. Arthritis Rheum. 1967 **10** 377 — 387.
- 17 — BONToux D., KAHAN A., BROUILHET H., AMOR B., DELBARRE F., JOUANNEAU M., GNIAZDOWSKA E. Effect and mode of action of chlorambucil in rheumatoid arthritis. The importance of the lymphoblast transformation test. Rev. Europ. Etud. Clin. Biol. 1971 **16** 166 — 172.

- 18 – BORSOS T., RAPP H.J., CRISLER C. The Interaction between carrageenan and the first component of complement.
J. Immun. 1965 **94** 662 – 666.
- 19 – BRENT, COURTENAY T., GOWLAND G. Immunological reactivity of lymphoid cells after treatment with anti-lymphocytic serum.
Nature 1967 **215** 1461 – 1464.
- 20 – BRESNICK E. The Metabolism « *in vitro* » of antitumor imidazolyl derivatives of mercaptopurines.
Abstract in Fed. Proc. 1959 **18** 371.
- 21 – BROOKES P., LAWLEY P.D. The reaction of mustard gas with nucleic acids « *in vitro* » and « *in vivo* ».
Biochem. J. 1960 **77** 478 – 484.
- 22 – BROOKES P., LAWLEY P.D. The Reaction of mono – and di – functional alkylating agents with nucleic acids.
Biochem. J. 1961 **80** 496 – 503.
- 23 – BROUILHET H. L'acide glycyrrhétinique et ses dérivés. Etudes chimique, expérimentale et clinique.
Thèse de médecine 1963 polycopiée 172 p.
- 24 – BROWN J.H., SCHWARTZ N.L., MACKEY H.K., MURRAY H.L. Prophylactic effects of cyclophosphamide in adjuvant – induced arthritis.
Arch. Int. Pharmacodyn. 1970 **183** 1 – 11.
- 25 – BURSTEIN N.A. WAKSMAN B.H. The Pathogenesis of adjuvant disease in the rat. I. A Histologic study of early lesions in the joints and skin.
Yale J. Biol. Med. 1964 **37** 177 – 194.
- 26 – BURSTEIN N.A., WAKSMAN B.H. The Pathogenesis of adjuvant disease in the rat.
II. A Radioautographic study of early lesions with the use of H3 thymidine.
Yale J. Biol. Med. 1964 **37** 195 – 202.
- 27 – Mc COLLISTER R.J., GILBERT W.R., WYNGAARDEN J.B. Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-mercaptopurine and other purine analogues.
J. Clin. Invest. 1962 **41** 1383.
- 28 – COSTE F., DELBARRE F., BASSET-LACRONIQUE F. Test pour apprécier l'action anti-inflammatoire des médicaments.
Sem. Hôp. Paris 1955 **31** 50 – 51.
- 29 – CURREY H.L.F., ZIFF M. Suppression of experimentally-induced polyarthritis in the rat by heterologous anti-lymphocyte serum.
LANCET 1966 **2** 889 – 891
- 30 – CURREY H.L.F., ZIFF M. Immunosuppressive action of heterologous anti-lymphocyte globulin in the rat.
Abstract in Fed. Proc. 1967 **26** 418.
- 31 – CURREY H.L.F., ZIFF, M., Suppression of adjuvant disease in the rat by heterologous antilymphocyte globulin.
J. Exp. Med. 1968 **127** 185 – 203.
- 32 – DALTON R.G., TOURAINE J.L., ANDERSON N.F., WOODRUFF M.F. Effect of route of administration of antilymphocytic globulin on skin allograft survival in rats.
Nature 1970 **225** 1140 – 1141.
- 33 – DAVIES G.E. Inhibition of guinea-pig complement in vitro and in vivo by carrageenin.
Immunology 1963 **6** 561 – 568.
- 34 – DELBARRE F., KAHN M.F., AMOR B. Modèle de polyarthrite expérimentale. Application à la sélection de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. Comunicazione al X congresso della lega internazionale contro il reumatismo. Roma 3 – 7 settembre 1961 **2** 1 – 4.
Ed. Minerva Medica Torino.

- 35 – DELBARRE F., KAHAN A., BROUILHET H., AMOR B. Etude analytique et critique des méthodes utilisées pour tester les médicaments anti-inflammatoires. I. Tests chez l'animal pp. 35 – 61.
IVème congrès International de rhumatologie d'Aix-les-Bains Juin 1964.
Imprimerie générale Grenoble 937 p.
- 36 – DELBARRE F., BROUILHET H., KAHAN A., AMOR B. Arthrites et polyarthrites expérimentales pp. 97 – 122. In : Actualités de physiologie pathologique 1ère série.
La Biologie de l'inflammation Paris Ed. Masson et Cie 1966.
- 37 – DELBARRE F., BROUILHET H., KAHAN A. Atténuation de la polyarthrite à adjuvant du rat par une phyto-hémagglutinine.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 1968 **162** 58 – 62.
- 38 – DELBARRE F., BROUILHET H., KAHAN A., AMOR B. Les Arthrites provoquées chez l'animal pp. 39 – 58. In : Etude expérimentale des anti-inflammatoires.
12ème et 13ème confrontations pharmacologiques. Paris Ed. Doin 1968.
- 39 – DENMAN A.M., DENMAN E.J., EMBLING P.H. Changes in the life-span of circulating small lymphocytes in mice after treatment with anti-lymphocyte globulin.
Lancet 1968 **1** 321 – 325.
- 40 – DENMAN A.M., FRENKEL E.P. Mode of action of anti-lymphocyte globulin. II. Changes in the lymphoid cell population in rats treated with anti-lymphocyte globulin.
Immunology 1968 **14** 115 – 126.
- 41 – DUMONDE D.C., GLYNN L.E. The Production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin.
Brit. J. Exp. Path. 1962 **43** 373 – 383.
- 42 – ELION G.B., HITCHINGS G.H. The Metabolism *in vivo* of antitumor imidazolyl derivatives of mercaptopurines.
Abstract in Fed. Proc. 1959 **18** 221.
- 43 – ELION G.B., CALLAHAN S., BIEBER S., HITCHINGS G. H., RUNDLES R.W. A Summary of investigations with 6 – [(1 methyl - 4-nitro - 5-imidazolyl) thio] purine
Cancer Chemother. Rep. 1961 **14** 93 – 98.
- 44 – ELION G.B., CALLAHAN S.W., HITCHINGS G.H., RUNDLES R.W., LASZLO J. Expérimental, clinical, and metabolic studies of thiopurines.
Cancer Chemoter. Rep. 1962 **16** 197 – 202.
- 45 – ELION G.B. Symposium on Immunosuppressive drugs. Biochemistry and Pharmacology of purine analogues.
Fed. Proc. 1967 **26** 898 – 904.
- 46 – FLAX M., WAKSMAN B.H. Further immunologic studies of adjuvant disease in the rat.
Int. Arch. Allerg. 1963 **23** 331 – 347.
- 47 – FORMANEK K., ROSAK M., STEFFEN C. Weitere Untersuchungen über die experimentelle Adjuvans – Arthritis der Ratte.
Int. Arch. Allerg. 1964 **24** 39 – 59.
- 48 – FREI E. Symposium on Immunosuppressive Drugs. Effect of cancer chemotherapeutic agents on normal tissues in man.
Fed. Proc. 1967 **26** 918 – 924.
- 49 – FRISCH A.W., DAVIES G.H. Inhibition of hemagglutinin synthesis by cytoxan.
Cancer Res. 1965 **25** 745 – 751.
- 50 – GERY I., WAKSMAN B.H. Studies of the mechanism whereby adjuvant disease is suppressed in rats pretreated with mycobacteria.
Int. Arch. Allerg. 1967 **31** 57 – 68.
- 51 – GERY I., WAKSMAN B.H. Competition of antigens in adjuvant disease of rats.
Arthritis Rheum. 1967 **10** 240 – 244.

- 52 — GLEEN E.M., GRAY J., KOOYERS W. Chemical changes in adjuvant-induced polyarthritis of rats.
Amer. J. Vet. Res. 1965 **26** 1195 — 1203.
- 53 — GLEEN E.M. Adjuvant-induced arthritis. Effects of certain drugs on incidence, clinical severity and biochemical changes.
Amer. J. Vet. Res. 1966 **27** 339 — 352.
- 54 — GLEEN E.M. Inhibition of adjuvant-induced polyarthritis with cytarabine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1968 **129** 860 — 865.
- 55 — GLYNN L.E. Communication personnelle.
- 56 — GREAVES M.F., TURSI A., PLAYFAIR J.H.L., TORRIGIANI G., ZAMIR R., ROITT I.M. Immunosuppressive potency and « *in vitro* » activity of antilymphocyte globulin.
Lancet 1969 **1** 68 — 72.
- 57 — GRINDLAY J.H., WAUGH J.N. Plastic sponge which acts a framework for living tissue. Experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysme.
A.M.A. Arch. Surg. 1951 **63** 288 — 297.
- 58 — HEIDELBERGER C. Biochemical mechanisms of action of fluorinated pyrimidines.
Exp. Cell. Res. 1963 suppl. **19** 462 — 471.
- 59 — HEKTOEN L., CORPER H.J. Effects of mustard gas on antibody formation.
J. Infect. Dis. 1921 **28** 279.
- 60 — HERSH E.M., WONG V.G., FREIREICH E.J. Inhibition of the local inflammatory response in man by anti-metabolites.
Blood 1966 **27** 38 — 48.
- 61 — HOUSSAY R.H. Polyarthropathie expérimentale par injection de cultures de mycobactéries.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 1961 **155** 159 — 161.
- 62 — HOUSSAY R.H., FRANGIONE B. On the pathogenesis of the arthropathy induced with Freund's adjuvant.
Atti del X congresso della lega internazionale contro il reumatismo Roma 3 — 7 Sett. 1961 950 — 951
Ed. Minerva Medica Torino.
- 63 — HURD E.R., ZIFF M. Studies on the anti-inflammatory action of 6-mercaptopurine.
J. Exp. Med. 1968 **128** 785 — 800.
- 64 — INDERBITZIN T. The Relationship of lymphocytes delayed cutaneous allergic reactions and histamine.
Int. Arch. Allerg. 1956 **8** 150 — 159.
- 65 — ISAKOVIÉ K., WAKSMAN B.H. Effect of sensitization to BSA on adjuvant disease in normal and neonatally thymectomized rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1965 **119** 676 — 678.
- 66 — JAMES K. Some factors influencing the ability of anti-lymphocytic antibody to suppress humoral antibody formation.
Clin. Exp. Immun. 1967 **2** 685 — 690.
- 67 — JAMES K., JUBB V.S. Effect of anti-rat lymphocyte antibody on humoral antibody formation.
Nature 1967 **215** 367 — 371.
- 68 — JAMES K., PULLARD D.M., JAMES V.S. Further studies on the effect of antilymphocytic antibody on humoral antibody formation.
Clin. Exp. Immun. 1968 **3** 963 — 972.
- 69 — JASMIN G. Prevention of experimental polyarthritis with sodium aurothiomalate.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 1957 **120** 349 — 353.
- 70 — JASMIN G. Experimental polyarthritis in rats injected with a tumour exudate.
Ann. Rheum. Dis. 1957 **16** 365 — 370.

- 71 – JESSOP J.D., CURREY H.L.F. Influence of gold salts on adjuvant arthritis in the rat.
Ann. Rheum. Dis. 1968 **27** 577 – 581.
- 72 – JONES R.S., WARD J.R. Tissue distribution of C¹⁴ labeled mycobacteria in adjuvant-induced polyarthritis.
Abstract in Arthritis Rheum. 1962 **5** 650 – 651.
- 73 – JONES R.S., WARD J.R. Studies on adjuvant-induced polyarthritis in rats. II Histogenesis of joint and visceral lesions.
Arthritis Rheum 1963 **6** 23 – 26.
- 74 – JONES R.S., WARD J.R. « *Adjuvant-induced polyarthritis in rats* ».
In Meth. Achiev. Exp. Path. 1966 **1** 607.
Ed. E. Bajusz and G. Jasmin Karger, New-York and Basel.
- 75 – KAHAN A., AMOR B., DELBARRE F. Polyarthrite du rat à mycoplasma arthritidis.
IV. Phénomènes immunologiques. Animaux soumis à l'immunisation active.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 1964 **158** 1320 – 1322.
- 76 – KAHAN A., AMOR B., DELBARRE F. Polyarthrite du rat à mycoplasma arthritidis.
V. Phénomènes immunologiques. Action d'une immunisation passive.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 1964 **158** 1470 – 1473.
- 77 – KALLIOMÄKI J.L., SAARIMAA H.A., TOIVANEN P. Inhibition by 6-mercaptopurine of polyarthritis induced by Freund's adjuvant.
Ann. Rheum. Dis. 1964 **23** 78 – 80.
- 78 – KAPUSTA M.A., MENDELSON J. Inhibition of adjuvant arthritis by statolon.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1967 **126** 496 – 499.
- 79 – KAPUSTA M.A., MENDELSON J. The Inhibition of adjuvant disease in rats by the interferon-inducing agent pyran - copolymer.
Arthritis Rheum. 1969 **12** 463 – 471.
- 80 – KAYIBANDA B., AMIEL J.L. Effects of heterospecific antilymphocyte serum on mouse spleen cells « *in vivo* » I.
Rev. Europ. Etud. Clin. Biol. 1970 **15** 437 – 441.
- 81 – KAYIBANDA B., DORE J.F., AMIEL J.L. « *in vitro* » immunisation by antilymphocyte serum II.
Rev. Europ. Etud. Clin. Biol. 1970 **15** 683 – 686.
- 82 – LACAPERE J., DELAVILLE G., BONHOMME F., GOULLET Ph., MARCHE J., VIAL M.C. Etude sur la polyarthrite expérimentale du rat.
Rev. Rhum. 1962 **29** 715 – 721.
- 83 – LACAPERE J. GOULLET Ph. Modifications électrophorétiques des protéines sériques du rat accompagnant la polyarthrite expérimentale consécutive à l'injection d'une émulsion de mycobactéries ou de certains de leurs constituants.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 1963 **257** 559 – 562.
- 84 – LACAPERE J. Notes sur la polyarthrite chronique rhumatoïde expérimentale du rat.
Presse Med. 1964 **72** 1549 – 1554.
- 85 – LACAPERE J., COHEN Y., DAGUET G., DELGA J., GOULLET Ph., MARCHE Cl., PASQUIER F., SEMAN G. Quelques notions récentes sur la polyarthrite expérimentale du rat.
Rev. Rhum. 1964 **31** 321 – 330.
- 86 – LAWLEY P.D., BROOKES P. Acidic dissociation of 7 : 9-dialkylguanines and its possible relation to mutagenic properties of alkylating agents.
Nature 1961 **192** 1081 – 1082.
- 87 – LECHAT P., GIROUD J.P., FONTAGNE J., DEYSSON G., ADOLPHE M. Essai de différenciation pharmacologique de certains anti-inflammatoires et immunodépresseurs.
J. Pharmacol. 1970 **1** 255 – 265.

- 88 — LEVEY R.H., MEDAWAR P.B. Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 1966 **56** 1130 — 1137.
- 89 — LEVEY R.H., MEDAWAR P.B. Some experiments on the action of antilymphoid antisera. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1966 **129** 164 — 177.
- 90 — LEVEY R.H., MEDAWAR P.B. Further experiments on the action of antilymphocytic antiserum. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 1967 **58** 470 — 477.
- 91 — LIEBERMANN G., BAUM J., FRENKEL E.P. Effect of anti-lymphocytic globulin on the immune response. Abstract in *Fed. Proc.* 1967 **26** 417.
- 92 — LIND A. Serological studies of mycobacteria by means of the diffusion - in - gel technique. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1961 **51** suppl. 144 323 — 325.
- 93 — LOWE J.S. Serum protein changes in rats with arthritis induced by mycobacterial adjuvant. *Biochem. Pharmacol.* 1964 **13** 633 — 641.
- 94 — LUKENS J.N., CARTWRIGHT G.E., WINTROBE M.M. Anemia of adjuvant-induced inflammation in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967 **126** 346 — 349.
- 95 — MAGUIRE H.C., MAIBACH H.I. Effect of cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, actinomycin D and vincalublastine on the acquisition of delayed hypersensitivity (DNCB contact dermatitis) in guinea pig. *J. Invest. Derm.* 1961 **37** 427 — 431.
- 96 — MALMGREN R.A., BENNISON B.E., Mc KINLEY T.W. Reduced antibody titers in mice treated with carcinogenic and cancer chemotherapeutic agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1952 **79** 484 — 488.
- 97 — MARTIN W.J., MILLER J.F. A.P. Site of action of antilymphocyte globulin. *Lancet* 1967 **2** 1285 — 1287.
- 98 — MAURER P. Communication personnelle.
- 99 — MIKOLAJEW M., KURATOWSKA Z., KOSSAKOWSKA M., PLACHECKA M., KOPEC M. Haematological changes in adjuvant disease in the rat.
I. Peripheral blood and bone marrow after repeated injections of Freund adjuvant. *Ann. Rheum. Dis.* 1969 **28** 35 — 40.
- 100 — MIKOLAJEW M., KURATOWSKA Z., KOSSAKOWSKA M., PLACHECKA M., KOPEC M. Haematological changes in adjuvant disease in the rat.
II. Iron metabolism and ⁵¹Cr erythrocyte survival. *Ann. Rheum. Dis.* 1969 **28** 172 — 179.
- 101 — MILLINGTON G.M.A., MOORE T.C. A rapid method for mass pattern skin grafting in the rat. *J. Surg. Res.* 1968 **8** 379 — 383.
- 102 — MORRIS P.J., BONDOC C., BURKE J.F. Effect of heterologous anti-lymphocyte serum on acute bacterial inflammation. *Surg. Forum* 1966 **17** 74 — 76.
- 103 — MORRIS P.J., BURKE J.F. Antilymphocyte serum and staphylococcal infection. *Nature* 1967 **214** 1138 — 1139.
- 104 — MUELLER M.N., KAPPAS A. Estrogen pharmacology.
II. Suppression of experimental immune polyarthritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1964 **117** 845 — 847.
- 105 — NEWBOULD B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *Brit. J. Pharmacol.* 1963 **21** 127 — 136.
- 106 — NEWBOULD B.B. Role of lymph nodes in adjuvant — induced arthritis in rats. *Ann. Rheum. Dis.* 1964 **23** 392 — 396.

- 107 — NEWBOULD B.B. Suppression of adjuvant-induced arthritis in rats with 2-butoxycarbonylmethylene-4-oxothiazolidine.
Brit. J. Pharmacol. 1965 **24** 632 — 640.
- 108 — NOUZA K. Screening of immunosuppressive drugs in the allotransplantation reaction between mice differing at the H-3 locus.
Folia Biol. 1966 **12** 226 — 277.
- 109 — OUTCHTERLONY O. Antigen-antibody reactions in gels.
Acta Path. Microbiol. Scand. 1949 **26** 507.
- 110 — PAGE A.R., CONDIE R.M., GOOD R.A. Effect of 6-mercaptopurine on inflammation.
Amer. J. Path. 1962 **40** 519 — 530.
- 111 — PAGE A.R., CONDIE R.M., GOOD R.A. Clinical studies on the anti inflammatory activity of 6-mercaptopurine.
Abstract in Blood 1962 **20** 118.
- 112 — PAGE A.R. Inhibition of the lymphocyte response to inflammation with antimetabolites.
Amer. J. Path. 1964 **45** 1029 — 1044
- 113 — PATKOWSKI J. On the mode of action of some immunosuppressant drugs.
J. Pharm. Pharmacol. 1968 **20** 957 — 958.
- 114 — PEARSON C.M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956 **91** 95 — 101.
- 115 — PEARSON C.M., WOOD F.D. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant.
I. General clinical and pathologic characteristics and some modifying factors.
Arthritis Rheum. 1959 **2** 440 — 459.
- 116 — PEARSON C.M. Development of arthritis in the rat following injection with adjuvant. pp. 647 — 671 in :
Mechanisms of hypersensitivity. Henry Ford Hospital International Symposium.
Eds. Schaffer J.H., Lo Grippo G.A. and Chase M.W. Little, Brown and Co, Boston 1959.
- 117 — PEARSON C.M., WAKSMAN B.H., SHARP J.T. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant.
V. Changes affecting the skin and mucous membranes. Comparison of the experimental process with human disease.
J. Exp. Med. 1961 **113** 485 — 510.
- 118 — PEARSON C.M., WOOD F.D. Factors which modify adjuvant-induced arthritis.
Abstract in Arthritis Rheum. 1962 **5** 654.
- 119 — PEARSON C.M. Experimental joint disease : observations on adjuvant-induced arthritis.
J. Chronic. Dis. 1963 **16** 863 — 874.
- 120 — PEARSON C.M., WOOD F.D., Mc DANIEL E.G., DAFT F.S. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant
VII. Pathologic details of the arthritis and spondylitis.
Amer. J. Path. 1963 **42** 73 — 95.
- 121 — PEARSON C.M., WOOD F.D., Mc DANIEL E.G., DAFT F.S. Adjuvant arthritis induced in germ-free rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1963 **112** 91 — 93.
- 122 — PEARSON C.M. Experimental models in rheumatoid disease.
Arthritis Rheum. 1964 **7** 80 — 86.
- 123 — PEARSON C.M., WOOD F.D. Passive transfer of adjuvant arthritis by lymph node or spleen cells.
J. Exp. Med. 1964 **120** 547 — 560.

- 124 — PEARSON C.M., WOOD F.D., TANAKA A. Adjuvant and arthritogenic effects of subfractions of wax D. from mycobacteria.
Abstract in Arthritis Rheum 1964 **7** 746.
- 125 — PEARSON C.M., WOOD F.D., TANAKA A. Antigenicity of mycobacterial subfractions and adjuvant-induced arthritis.
Programme of animal meeting of Amer. Rheum. Ass. 1968 (abstract) p. 57.
- 126 — PEARSON C.M., WOOD F.D., TANAKA A.
Abstract in Bull. Rheum. Dis. 1968 **19** 530.
- 127 — PHILLIPS J.M., KAKLAMANIS P., GLYNN L.E. Experimental arthritis associated with auto-immunization to inflammatory exudates.
Ann. Rheum. Dis. 1966 **25** 165 — 174.
- 128 — POMPIDOU A., BROUILHET H., JOUANNEAU M., ARNOULD G., MICHEL P., DELBARRE F., SCHRAMM B. Essai du cyclophosphamide sur l'arthrite du lapin provoquée par un exsudat inflammatoire homologue. Etude histologique de la synoviale fémoro-tibiale quinze jours après l'injection déclenchante.
Path. Biol. 1970 **18** 33 — 39.
- 129 — POSSANZA G.J., STEWART P.B. Suppressant effect of procarbazine and its comparison with antilymphocyte serum in adjuvant-induced polyarthritis in rats.
Clin. Exp. Immun. 1970 **6** 291 — 297.
- 130 — QUAGLIATA F., SANDERS P.M., GARDNER D.L. Inhibition of rat adjuvant arthritis by a new immunosuppressive agent rubidomycin.
Experientia 1968 **24** 1028 — 1029.
- 131 — QUAGLIATA F., SANDERS P.M., GARDNER D.L. Suppression of adjuvant arthritis by a new cytotoxic compound, rubidomycin.
Ann. Rheum. Dis. 1969 **28** 163 — 171.
- 132 — Van ROBERTSON B.W., SCHWARTZ B. Ascorbic acid and the formation collagen.
J. Biol. Chem. 1953 **201** 689 — 696.
- 133 — ROSS W.C. In vitro reactions of biological alkylating agents.
Ann. NY. Acad. Sci. 1958 **68** 669 — 681.
- 134 — ROSS W.C.J. Biological alkylating agents.
Butterworth and Co Ltd London 1962 232 p.
- 135 — RYÅZEWSKA A.G. Influence of lymphatic tissue on the development of adjuvant-induced polyarthritis in rats.
Ann. Rheum Dis. 1967 **26** 506 — 516.
- 136 — SAHIAR K., SCHWARTZ R.S. The Immunoglobulin sequence. II. Histological effects of the suppression of gamma M et gamma G antibody synthesis.
Int. Arch. Allerg. 1966 **29** 52 — 68.
- 137 — SANTOS G.W., OWENS A.H. A Comparison of the effects of selected cytotoxic agents on allogeneic skin graft survival in rats.
Bull. Hopkins Hosp. 1965 **116** 327 — 340.
- 138 — SANTOS G.W. Symposium on immunosuppressive drugs
Immunosuppressive drugs I.
Fed. Proc. 1967 **26** 907 — 913.
- 139 — SCHACHTER J., BARNES M.G., JONES J.P., ENGLEMAN E.P., MEYER K.F. Bedsonia isolation studies in human arthritis.
Arthritis Rheum. 1966 **9** 538 — 539.
- 140 — SCHWARTZ R., STACK J., DAMESHEK W. Effect of 6-mercaptopurine on antibody production.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958 **99** 164 — 167.

- 141 — SCHWARTZ R.S., EISNER A., DAMESHEK W. The effect of 6- mercaptopurine on primary and secondary immune responses.
J. Clin. Invest. 1959 **38** 1394 — 1403.
- 142 — SCHWARTZ R.S. Immunosuppressive drug therapy. pp. 440 — 471.
in Human transplantation. Eds Rapaport F.T. and Dausset J. New York and London Grune and Straton 1968.
- 143 — SHARP J.T., WAKSMAN B.H., PEARSON C.M., MADOFF S. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant.
IV. Examination of tissues and fluids for infectious agents.
Arthritis Rheum. 1961 **4** 169 — 175.
- 144 — STEVENS J.E., WILLOUGHBY D.A. The Anti-inflammatory effect of some immunosuppressive agents.
J. Path. 1969 **97** 367 — 373.
- 145 — TURK J.L. Studies on the mechanism of action of methotrexate and cyclophosphamide on contact sensitivity in the guinea pig.
Int. Arch. Allerg. 1964 **24** 191 — 200.
- 146 — TURK J.L., WILLOUGHBY D.A., STEVENS J.E. An analysis of the effects of some types of anti-lymphocyte sera on contact hypersensitivity and certain models of inflammation.
Immunology 1968 **14** 683 — 695.
- 147 — VALERIOTE F.A., BRUCE W.R., MEEKER B.E. Synergistic action of cyclophosphamide and 1,3 bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea on a transplanted murine lymphoma.
J. Nat. Cancer Inst. 1968 **40** 935 — 944.
- 148 — WAKSMAN B.H., PEARSON C.M., SHARP J.T. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant.
II. Evidence that the disease is a disseminated immunologic response to exogenous antigen.
J. Immun. 1960 **85** 403 — 417.
- 149 — WAKSMAN B.H., SHARP J.T. Immunologic nature of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant.
Abstract in Fed. Proc. 1960 **19** 210.
- 150 — WAKSMAN B.H., WENNERSTEN C. Passive transfer of adjuvant arthritis in rats with living lymphoid cells of sensitized donors.
Int. Arch. Allerg. 1963 **23** 129 — 139.
- 151 — WALZ D.T., DI MARTINO M.J., KUCH J.H., ZUCCARELLO W. Adjuvant-induced arthritis in rats.
I. Temporal relationship of physiological, biochemical and hematological parameters.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1971 **136** 907 — 910.
- 152 — WARD J.R., JONES R.S. Studies on adjuvant-induced polyarthritis in rats.
I. Adjuvant composition route of injection and removal of depot site.
Arthritis Rheum. 1962 **5** 557 — 564.
- 153 — WARD J.R., JONES S.R. Tuberculin hypersensitivity and adjuvant induced polyarthritis in rats.
Abstract in Fed. Proc. 1963 **22** 670.
- 154 — WARD J.R., CLOUD R.S., KRAWITT E.L., JONES R.S. Studies on adjuvant-induced polyarthritis in rats.
III. The Effect of « immunosuppressive agents » on arthritis and tuberculin hypersensitivity.
Arthritis Rheum. 1964 **7** 654 — 661.
- 155 — WARD J.R., CLOUD R.S. Comparative effect of antirheumatic drugs on adjuvant-induced polyarthritis in rats.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1966 **152** 116 — 121.
- 156 — WAY J.L., PARKS R.E. Enzymatic synthesis of 5-phosphate nucleotides of purine analogues.
J. Biol. Chem. 1958 **231** 467 — 480.

- 157 — WHEELER G.P. Symposium on immunosuppressive drugs. Some biochemical effects of alkylating agents. Fed. Proc. 1967 **26** 885 — 892.
- 158 — WHITEHOUSE M.W. Some biochemical properties and a possible mode of action of antirheumatic drugs. Acta Rheum. Scand. 1964 Suppl. **8** 5 — 8.
- 159 — WHITEHOUSE M.W. Some biochemical and pharmacological properties of anti-inflammatory drugs. In : « Progress in drug research ». Eds. Jurker E. 1965 **8** 321 — 429 Basel and Stuttgart Birkhäuser.
- 160 — WHITEHOUSE M.W., WHITEHOUSE D.J. Inhibition of rat adjuvant arthritis without drugs or antibody therapy. Programme of animal meeting of Amer. Rheum. Ass. (abstract) 1968 p. 58.
- 161 — WHITEHOUSE M.W. The Molecular pharmacology of anti-inflammatory drugs : some possible mechanisms of action at the biochemical level. Biochem. Pharmacol. 1968 suppl. 293 — 307.
- 162 — WILLIS A.L. In « Prostaglandins, peptides and amines » p. 31. Eds. P. Mantegazza and E.W. Horton New-York Academic Press 1969.
- 163 — WILLOUGHBY D.A., GIROUD J.P. Etude de la réponse inflammatoire chez le rat et le cobaye. Bull. Acad. Nat. Med. 1970 **154** 53 — 61.
- 164 — WINTER C.A., RISLEY E.A., NUSS G.W. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an essay for anti inflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962 **111** 544 — 547.
- 165 — WINTER C.A., NUSS G.W. Treatment of adjuvant arthritis in rats with anti-inflammatory drugs. Arthritis Rheum 1966 **9** 394 — 404.
- 166 — WOOD F.D., PEARSON C.M. Protection of rats against adjuvant arthritis of bacterial lipopolysaccharides. Science 1962 **137** 544 — 545.
- 167 — WOOD F.D., PEARSON C.M., TANAKA A. Capacity of mycobacterial Wax D and its subfractions to induce adjuvant in rats. Int. Arch. Allerg. 1969 **35** 456 — 467.
- 168 — WOODRUFF M.F., ANDERSON N.A. Effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of anti-lymphocytic serum on the survival of skin homografts in rats. Nature 1963 **200** 702.
- 169 — ZOLA H., MOSEDALE B., THOMAS D. The preparation and properties of antisera to subcellular fractions from lymphocytes. Transplantation 1970 **9** 259 — 272.

PLANCHE N° 1

H E M O G R A M M E N O R M A L

Rats mâles — SPRAGUES DAWLEY — âgés de 9 semaines.

H E M O G R A M M E	M ± s
Micro-Hématocrite 30 rats	43,54 % ± 3,44 %
Numération Différentielle 45 rats	
Leucocytes totaux	12.850 ± 3.400
Polynucléaires	1.647 ± 855
Cellules Monoculées	11.203 ± 3.215

Formule Sanguine 42 rats (200 éléments)	
Polynucléaires Neutrophiles	8,19 % ± 5,24 %
Polynucléaires Eosinophiles	0,28 % ± 0,48 %
Petits Lymphocytes	66,87 % ± 15,49 %
Grands Lymphocytes	18,76 % ± 11,49 %
Monocytes	5,89 % ± 3,76 %

PLANCHE N° II

MYELOGRAMME NORMAL

Rats mâles — SPRAGUE DAWLEY — âgés de 9 semaines

MYELOGRAMME	M ± s
Nombre de rats	42
<u>SERIE MYELOCYTAIRE</u>	22,27 ± 4,82 %
— MYELOBLASTES	0,35 ± 0,19 %
— PROMYELOCYTES	0,75 ± 0,33 %
— MYELOCYTES	9,11 ± 3,01 %
— METAMYELOCYTES	12,04 ± 3,16 %
— POLYNUCLEAIRES	17,10 ± 3,81 %
— LYMPHOCYTES	34,56 ± 6,32 %
— MONOCYTES	1,81 ± 1,65 %
— PLASMOCYTES	0,29 ± 0,37 %
<u>SERIE ERYTHROBLASTIQUE</u>	23,20 ± 5,00 %
— PROERYTHROBLASTES	0,48 ± 0,30 %
— ERYTHROBLASTES BASOPHILES	3,36 ± 1,50 %
— ERYTHROBLASTES POLYCHROMA- TOPHILES	8,63 ± 3,27 %
— ERYTHROBLASTES ACIDOPHILES	10,98 ± 3,57 %
— CELLULES SOUCHES MONO- CYTOIDES	0,44 ± 0,44 %
— CELLULES RETICULAIRES	0,39 ± 0,30 %

PLANCHE N° III

HEMOGRAMME NORMAL

Rats mâles — WISTAR — pesant 200 ± 20 grammes.

HEMOGRAMME	M ± s
Numération Différentielle 116 rats	
Leucocytes Totaux	15.978 ± 5.697
Polynucléaires	3.350 ± 1.858
Cellules Mononucléées	12.628 ± 4.556

Formule Sanguine 96 Rats (200 éléments)	
Polynucléaires Neutrophiles	14,26 % ± 8,77 %
Polynucléaires Eosinophiles	1,30 % ± 1,12 %
Petits Lymphocytes	59,95 % ± 13,70 %
Grands Lymphocytes	16,34 % ± 6,36 %
Monocytes	8,20 % ± 3,83 %

PLANCHE N° IV

MYELOGRAMME NORMALRats mâles — WISTAR — pesant 200 ± 20 grammes

MYELOGRAMME	M $\pm$ s
Nombre de rats	72
<u>SERIE MYELOCYTAIRE</u>	22,35 $\pm$ 4,88 %
— MYELOBLASTES	0,38 $\pm$ 0,29 %
— PROMYELOCYTES	0,60 $\pm$ 0,31 %
— MYELOCYTES	6,52 $\pm$ 2,20 %
— METAMYELOCYTES	14,84 $\pm$ 3,53 %
— POLYNUCLEAIRES	24,75 $\pm$ 4,86 %
— LYMPHOCYTES	28,02 $\pm$ 6,63 %
— MONOCYTES	3,95 $\pm$ 1,85 %
— PLASMOCYTES	0,81 $\pm$ 0,73 %
<u>SERIE ERYTHROBLASTIQUE</u>	19,71 $\pm$ 6,75 %
— PROERYTHROBLASTES	0,29 $\pm$ 0,24 %
— ERYTHROBLASTES BASOPHILES	2,54 $\pm$ 1,39 %
— ERYTHROBLASTES POLYCHROMATOPHILES	10,90 $\pm$ 4,44 %
— ERYTHROBLASTES ACIDOPHILES	6,03 $\pm$ 2,53 %
— CELLULES SOUCHES MONOCYTOIDES	0,08 $\pm$ 0,17 %
— CELLULES RETICULAIRES	0,12 $\pm$ 0,19 %

